



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS RECEPTORES
A_{2A}/D₂ EN EL GLOBO PÁLIDO DE LA RATA NORMAL
Y HEMIPARKINSÓNICA**

T E S I S

Que presenta

M. en C.F. Sergio Recillas Morales

Para obtener el grado de

DOCTOR EN FARMACOLOGÍA

Director de la Tesis:

Dr. Benjamín Florán Garduño

México, D.F.

Diciembre, 2013

Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio número 4 del departamento de fisiología, biofísica y neurociencias con la tutela del Doctor Benjamín Florán Garduño y con el apoyo del consejo nacional de ciencia y tecnología, CONACyT gracias al donativo número 152326.

Agradecimientos:

A Benjamín Florán por su conducción paciente, por compartirme su arte y la ciencia, gracias amigo.

A todos mis compañeros de laboratorio por su apoyo y fraternidad, especialmente a Hernán, Arturo y René, por brindarme las palabras de apoyo cuando las circunstancias fueron adversas, también a Luis y Felipe por su amistad a toda prueba.

A Paco, José Luís y a Chelita, muchas gracias por su apoyo incondicional.

A mi entrañable familia, de la que me he tenido que alejar físicamente, los amo.

A mi amada Hortensia, a tu lado todo ha sido más sencillo, lo logramos.

Índice:

Resumen: -----	6
Abstract: -----	7
Introducción: -----	8
Antecedentes: -----	10
Los receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G. -----	10
El receptor a adenosina A_{2A}. -----	12
El receptor de dopamina D₂. -----	16
Vías alternas de señalización del receptor A_{2A} y D₂. -----	18
La dimerización entre los receptores acoplados a proteínas G. -----	20
El fenómeno de la dimerización entre los receptores A_{2A} y D₂. -----	22
Mecanismos moleculares y efectos funcionales de la interacción del dímero A_{2A}/D₂. -----	26
La CAMKII y los receptores acoplados a proteínas G. -----	33
Planteamiento del problema: -----	37
Hipótesis: -----	38
Objetivo general: -----	39
Objetivos específicos: -----	40
Material y métodos -----	41
Sujetos experimentales:-----	41
Lesión dopaminérgica con 6-OHDA: -----	41
Disminución de dopamina endógena mediante el tratamiento con reserpina: -----	42
Experimentos de liberación de [³ H]GABA: -----	42
Obtención de sinaptosomas: -----	44
Experimentos de acumulación de AMPc: -----	45
Ensayos de acumulación de fosfoinosítidos: -----	46
Experimentos de coimmunoprecipitación y westernblot: -----	47
Análisis estadístico:-----	49
Resultados -----	50

Discusión:	-----	67
Conclusiones:	-----	80
Bibliografía:	-----	81

Resumen:

Los receptores A_{2A} y D2 se encuentran altamente coexpresados en la terminal estriado-palidal, como resultado de esta coexpresión se propone pueden estar formando una unidad dimérica funcional, en este trabajo damos evidencia de una interacción de tipo proteína-proteína entre ambos receptores, además de que encontramos que la vía de señalización del dímero A_{2A}/D2 en condiciones de despolarización es a través de un acople a una proteína G_{q/11} → PLC → PCK → Canal de calcio tipo L, mientras que en condiciones en las que la terminal no se encuentra despolarizada el dímero señala por medio de un acople a una proteína G_{s/olf} → AC → PKA, también evidenciamos el papel de la CaMKII en el proceso de señalización la cual parece determinar la forma en la que el dímero transduce su señal, es decir mientras en condiciones de despolarización de la terminal el dímero se acopla a una proteína G_{q/11} en condiciones no despolarizantes el dímero se acopla a una proteína G_{s/olf}.

Exploramos también en este trabajo el papel del dímero en condiciones de párkinson experimental, encontrando que la CaMKII regula al dímero aunque de manera distinta a la condición normal, en donde al parecer la actividad de la CaMKII sobre el dímero se pierde dejando como única vía de señalización en esta condición experimental la vía de la adenilato ciclasa → PKA mediante el acople a una proteína de tipo G estimuladora.

Abstract:

A_{2A} and D2 receptors are highly expressed in striato-pallidal terminals, as a result of these coexpression it has been proposed they may be forming a functional dimeric structure, in this work we give evidence of an protein-protein interaction between both receptors, we also found the A_{2A}/D2 signaling transduction pathway in depolarized condition that seems to be throughout G_{q/11} → PLC → PKC → type L calcium channel while in non depolarized condition the dimer signalize coupling to a G_{s/olf} → AC → PKA. Moreover we studied the CaMKII participation in the signaling process which can switch the transduction pathway depending on its activation state.

Finally we explored the CaMKII participation in the experimental Parkinson condition our results shows that CaMKII may regulate the dimer in a different way compared whit the normal condition. CaMMKII seems to lose control over the dimer leading as the only transduction pathway the adenylate cyclase → PKA by a stimulatory G protein coupling.

Introducción:

Clásicamente se ha estudiado a los receptores de 7 dominios transmembranales como unidades funcionales capaces de generar una respuesta fisiológica típica tras su activación, estos receptores por mucho tiempo han sido considerados como de una única vía de señalización, por ejemplo, por mucho tiempo se ha propuesto que los receptores de dopamina del tipo D2 tras ser activados se acoplan de manera negativa a una adenilato ciclasa disminuyendo consecuentemente los niveles de AMPc en las neuronas y generando con esto un efecto inhibitorio. A principios de los ochentas esta manera de ver a los receptores que podríamos definir como “un agonista, un receptor, una respuesta fisiológica” comenzó a modificarse basándose en experimentos y en resultados que simplemente no podían ser explicados al revisar la farmacología clásica del receptor, esto dio pie a la propagación de una teoría diferente y actualmente en desarrollo por ciertos grupos de investigación que no deja de ser controversial y en discusión, nos referimos a la heteromerización, una interacción que se plantea puede involucrar a receptores de la misma familia y diferente subtipo, a receptores de diferentes familias y subtipos o una mezcla de estas posibilidades.

Con el advenimiento de mejores y cada vez más avanzadas técnicas bioquímicas y moleculares poco a poco se ha podido avanzar en la comprensión de este fenómeno expandiendo las posibilidades y horizontes en el terreno de la farmacología que hoy por hoy está experimentando cambios en los conceptos más elementales. Una interacción que hasta la fecha ha sido ampliamente estudiada es la que se presenta entre los receptores de adenosina A_{2A} y los receptores de dopamina D2, mucho se ha investigado y avanzado en lo relativo a esta interacción, podría decirse, un hecho muy aceptado que estos receptores particularmente en las neuronas de proyección estriado-palidales se encuentran formando una unidad dimérica con características funcionales y estructurales muy específicas. Estas respuestas funcionales podrían incluir fenómenos poco estudiados como el cambio de acople de al menos uno de los receptores involucrados en esta relación, un cambio de acople a su proteína G prototípica que tendría resultados diferentes a los aceptados en la literatura clásica.

Para los estudiosos de esta relación dimérica resulta interesante comprender a cabalidad la naturaleza más elemental de esta interacción, comprenderla se piensa, podría significar expandir no sólo el estado de conocimiento de los mecanismos por los cuales los sistemas diméricos se modulan, más importante resulta la posibilidad de instaurar mejores alternativas terapéuticas en padecimiento como la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia o desordenes de conducta como la ansiedad y depresión.

Con este trabajo pretendemos contribuir al entendimiento de la manera en que ambos receptores se encuentran dimerizando, sus posibles implicaciones a nivel macro en procesos fisiológicos y patológicos y a nivel molecular el cómo y el porqué de la existencia de esta unidad estructuralmente funcional.

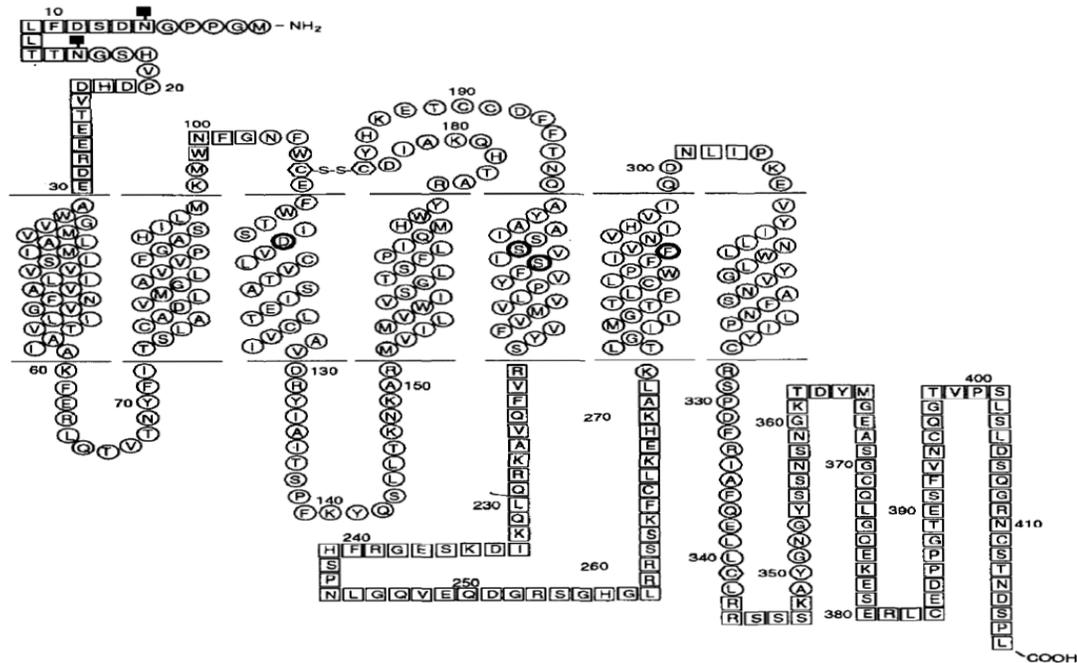
Antecedentes:

Los receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G.

Los receptores de siete dominios transmembranales o GPCRs por sus siglas en inglés conforman una superfamilia de receptores que se expresan en la superficie celular, esta familia de receptores se encuentra constituida por aproximadamente 2000 receptores diferentes que se encuentran a su vez clasificados en alrededor de 100 subfamilias de acuerdo a su homología, estructura de su ligando endógeno, o su función (Ji, Grossmann et al. 1998, Premont and Gainetdinov 2007). A pesar de la amplia variedad de agonistas que estimulan a estos receptores, estos comparten una homología estructural considerable que en el fondo refleja un mecanismo de acción muy parecido. Estos receptores se caracterizan por tener siete segmentos de 20 a 25 aminoácidos (Figura 1), los cuales constituyen las porciones transmembranales del receptor conectados por un total de 7 asas de manera alternada en el medio intracelular y extracelular encontrándose en el medio intracelular su dominio C-terminal y en el medio extracitoplásmico su dominio N-terminal (Strader, Fong et al. 1994).

Posterior a la activación del receptor la vía de señalización es bastante común entre los receptores que pertenecen a esta familia, esta cascada de señalización se inicia con la unión del receptor a su agonista específico. Esta integración causa un cambio conformacional en el receptor que le permite interactuar con una proteína G heterotrimérica en la membrana celular, formándose a partir de aquí un complejo de alta afinidad constituido por el agonista, el receptor y la proteína G. La interacción del receptor con la proteína G produce una disociación de dicha proteína en tres subunidades, una subunidad α por un lado y una unidad dimérica conformada por una subunidad $\beta\gamma$, esta disociación acontece gracias a el intercambio de una molécula de GDP en la subunidad α por una molécula de GTP lo que convierte a la proteína G a su estado activo (Figura 2). Una vez activada esta proteína puede señalizar a través de la estimulación o inhibición de una colección muy diversas de efectores que pueden

Figura 1



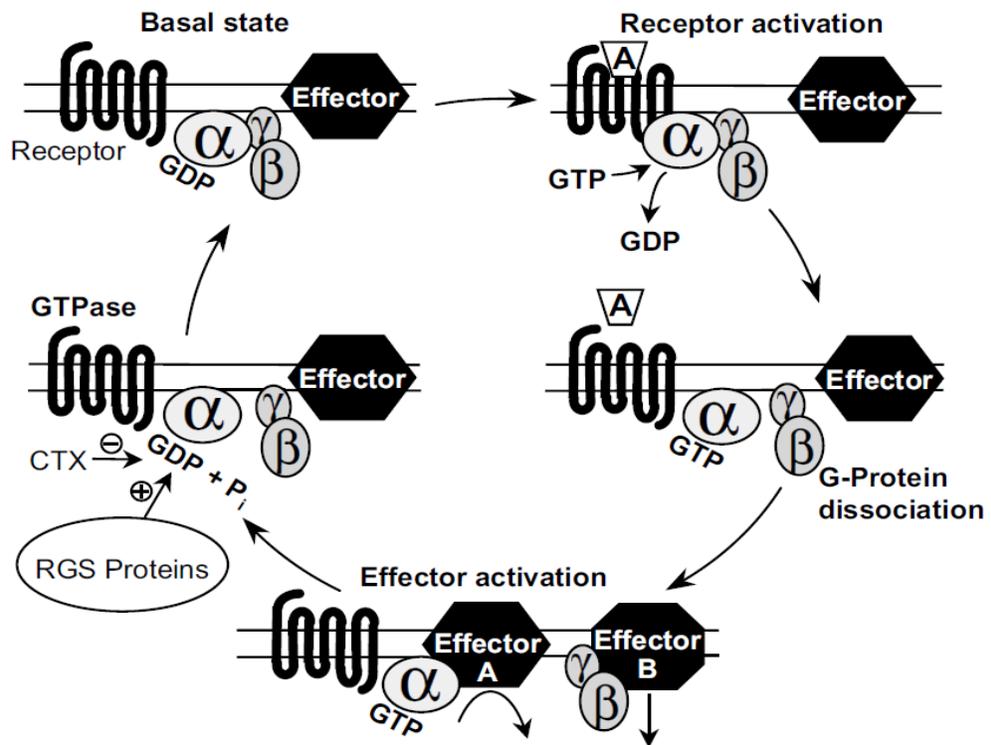
Estructura primaria de la topología de un receptor de 7 dominios transmembranales acoplados a proteínas G. Se aprecian los siete segmentos transmembranales interconectados por 3 asas intracelulares y tres asas extracelulares, un dominio C-terminal en la porción intracitoplásmica y un dominio N-terminal en el compartimiento extracelular (tomado de Stradler 1994).

ser enzimas, canales iónicos, adenilato ciclasa, guanil ciclasa y fosfolipasa C principalmente (Conklin and Bourne 1993).

Un mecanismo importante en la regulación de la actividad de los receptores acoplados a proteínas G es la cinasa de los receptores acoplados a proteínas G ó GRK por sus siglas en inglés, las GRKs reconocen a los receptores activados y los fosforilan en los dominios intracitoplásmicos incluyendo el dominio C-terminal, una vez fosforilado, el receptor se convierte en un sustrato adecuado para la β -arrestina, evento que previene el receptor pueda activar proteínas G adicionales, además de que el complejo receptor-GRK- β -arrestina resulta en la conclusión de

la actividad de receptor iniciada por su activación (Penn, Pronin et al. 2000, Ferguson 2001, Offermanns 2003, Premont 2005).

Figura 2



Ciclo de activación de los receptores acoplados a proteínas G. Cuando un receptor de 7 dominios transmembranales es activado por su agonista se intercambia una molécula de GDP por GTP y la proteína G heterotrimérica se disocia en dos subunidades las cuales son capaces de interactuar con sus efectores para generar una respuesta fisiológica, una vez ejercido su efecto, por medio de GTPasas la molécula de GTP es convertida en GDP volviendo al receptor a su estado inactivo (Tomado Offermanns 2003).

El receptor a adenosina A_{2A}.

El concepto de receptor sensitivo a metilxantinas activados por adenosina fue establecido a principios de los 70's cuando se descubrió que los derivados de la

adenosina eran capaces de generar un incremento de AMPc intracelular, entonces se sugirió la existencia de dos diferentes tipos de receptores de adenosina, los que al activarse generaban un aumento de AMPc y los que por el contrario tras ser activados lo disminuían (Svenningsson, Le Moine et al. 1999). Estos receptores dentro de la clasificación de receptores purinérgicos se ubican en la subfamilia P1, la cual se encuentra conformada por los receptores A1, A_{2A}, A_{2B} Y A3 (Illes, Klotz et al. 2000). Dichos receptores fueron llamados de esta manera de acuerdo a su afinidad por la adenosina, su agonista endógeno (Haas and Selbach 2000). Con base en la habilidad de la adenosina de estimular a la adenilato ciclasa en rebanadas de cerebro se dividieron a los receptores A2 en dos subtipos: el receptor A_{2A}, con una alta afinidad por la adenosina (0.1-1.0 μ M) y el receptor A_{2B} con una considerable menor afinidad (≥ 10 μ M) (Fredholm, Cunha et al. 2003). El receptor A_{2A} se encuentra en una amplia variedad de órganos y tejidos incluyendo tejidos periféricos (hígado, corazón, pulmones y el sistema inmunológico) así también como el sistema nervioso central (Fredholm, Chern et al. 2007). Dicho receptor se expresa en altos niveles sólo en algunas regiones del cerebro, caso concreto el núcleo estriado, el bulbo olfatorio e hipocampo (Sebastiao and Ribeiro 1996, Dunwiddie and Masino 2001). El receptor A_{2A} pertenece a la familia de receptores de 7 dominios transmembranales acoplados a proteínas G (Hurley, Mash et al. 2000). Los 7 dominios transmembranales se encuentran conectados por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares altamente hidrofílicas, un modelo en 3D del receptor utilizando un método de modelado molecular demuestra que el sitio activo para la unión al ligando se encuentra próximo a 5 segmentos transmembranales (TM2, TM3, TM5, TM6 y TM7) (Tuccinardi, Ortore et al. 2006, Ye, Wei et al. 2008). Se sabe que tras su activación este receptor se acopla a una proteína G de tipo estimuladorio G_{s/olf}.

Una característica del receptor A_{2A} que es de particular interés es su inusual largo dominio carboxilo terminal que en el humano está conformado por 122 aminoácidos y en la rata por 125 aminoácidos. Este receptor cuenta con dos peculiaridades, la primera es que se une a sus proteínas G mediante un proceso conocido como unión de colisión restringida, en donde un receptor puede interferir la activación total de otro sobre la adenilato ciclasa. Por otra parte un segundo fenómeno que Tolkovsky

en 1978 describe, que de un pool de adenilato ciclasa disponible para ser activado, solo el 70% responde a la estimulación con adenosina en experimentos de eritrocitos de pavo, este proceso se traduce en la inhabilidad del receptor de acceder a todas las moléculas de adenilato ciclasa en la membrana plasmática (Tolkovsky and Levitzki 1978, Braun and Levitzki 1979). El receptor A_{2A} forma un complejo muy estrecho con las proteínas G_s , este complejo tiene la característica de ser resistente a la disociación por los nucleótidos de guanina. Por otra parte el receptor puede ser solubilizado en un complejo con su proteína G_s en ausencia del agonista, por lo tanto el receptor parece estar preacoplado a su proteína G (Zezula and Freissmuth 2008). Tras la activación de la proteína G, canales iónicos y enzimas son afectadas; en el caso de las proteínas G activadas por el receptor A_{2A} éstas se acoplan de manera positiva a la adenilato ciclasa generando un aumento en la formación de AMPc intracelular dando como resultado la fosforilación de canales de calcio. También se ha descrito que tras la activación del receptor A_{2A} se promueve una movilización de calcio intracelular de estructuras que lo almacenan como retículo endoplásmico, activación de MAPK, regulación de ERK, SAPK, JUNK, teniendo impacto en procesos de diferenciación celular o en el metabolismo de la célula (Fredholm, Arslan et al. 2000, Fredholm, AP et al. 2001).

Desde el punto de vista funcional los receptores A_{2A} están involucrados en una amplia gama de procesos fisiológicos, como lo son el control de la inflamación, a través de la modulación de la activación de neutrófilos, control de la degranulación y liberación de citosinas, migración celular endotelial, síntesis de colágeno en células dermales, revascularización de los tejidos dañados, sistema cardiovascular, tracto gastrointestinal y una larga lista de procesos fisiológicos así como procesos patológicos como el asma (Valls, Cronstein et al. 2009, Jaakola and Ijzerman 2010). Esta extensa participación del receptor A_{2A} se puede entender gracias a la adenosina pues a través de este receptor y a sus otros tres receptores relacionados tiene injerencia virtualmente en todo órgano y tejido (Klinger, Freissmuth et al. 2002). Un apartado muy importante para nuestro trabajo es el papel de este receptor en el sistema nervioso en donde la adenosina funciona como un neuromodulador. La adenosina en condiciones normales se genera en ambos compartimentos celulares,

extracelular e intracelular y su síntesis es modulada por 5'-nucleosidasas que desfosforilan AMP, o por hidrólisis de S-adenosil-homocisteina (Svenningsson, Le Moine et al. 1999), esta adenosina puede ser transportada del interior de la célula al exterior o viceversa por medio de transportadores específicos que pueden ser de tipo distributivos o concentrativos respectivamente para que pueda ejercer sus efectos a demanda (Fredholm, AP et al. 2001, Fields and Burnstock 2006, Fredholm, Chern et al. 2007).

Los receptores A_{2A} en el sistema nervioso central se encuentran expresados de manera muy circunscrita a ciertos núcleos, específicamente se encuentran altamente expresados en neuronas GABAérgicas del estriado, bulbo olfatorio e hipocampo (Ribeiro, Sebastião et al. 2002) , desde el punto de vista celular en el sistema nervioso central los receptores a adenosina A_{2A} se encuentran localizados en los cuerpos celulares de la vía indirecta del movimiento a nivel del estriado, también se encuentran presentes en las proyecciones colaterales recurrentes hacia el estriado y en las terminales del globo pálido. En contraste este receptor no se expresa en la vía directa del movimiento que inerva a la sustancia nigra reticulata. Por tanto puede decirse que este receptor se expresa de manera somatodendrítica en las neuronas estriado palidales confiriéndole un tropismo muy específico que redundará en una serie de interacciones muy específicas con otros receptores que se encuentran preferencialmente también en esta subpoblación neuronal (Kase, Mori et al. 2004, Orru, Bakesova et al. 2011) como los receptores de dopamina D2 (Linden 2001).

Gracias a la síntesis de un agonista selectivo para el receptor A_{2A}, el CGS21680 ha sido posible caracterizar el mecanismo de acción de este receptor así como su papel en diversos procesos celulares (Mayfield, Suzuki et al. 1993), sin embargo esta selectividad del fármaco se pierde a concentraciones superiores a 1µM (Linden 2001) un hecho que consideramos durante el desarrollo de este proyecto.

El receptor de dopamina D2.

Los receptores a dopamina son receptores de 7 dominios transmembranales acoplados a proteínas G, estos receptores conforman una familia que por sus características se divide en dos subtipos, los receptores de dopamina D1 like en donde se encuentran los receptores D1 y D5 que se caracterizan por acoplarse de manera positiva o estimuladora a la adenilato ciclasa y la familia D2 like en la cual se encuentran los receptores a dopamina del tipo D2, D3, y D4, los cuales clásicamente se ha propuesto se acoplan negativamente a la adenilato ciclasa. La dopamina es la catecolamina de mayor presencia en el sistema nervioso central, se encuentra involucrada en la regulación de una variedad de funciones que incluyen la actividad locomotora, la emotividad el afecto y el aprendizaje, así como la regulación de la secreción neuroendócrina. Un desorden de el funcionamiento de las neuronas dopaminérgicas puede conducir a una serie de condiciones patológicas cómo la enfermedad de Parkinson y la esquizofrenia por citar sólo algunas, de aquí que pueda entenderse la importancia de este neurotransmisor a nivel de sistema nervioso central (Jaber, Robinson et al. 1997). Hace aproximadamente 35 años se hipotetizo acerca de la existencia de dos receptores a dopamina, en ese tiempo llamados receptor D1 y receptor D2, no fue sino con el advenio de mejores técnicas moleculares que a partir de 1988 se pudo demostrar la existencia de otros subtipos de receptores, los receptores D3, D4 y D5 los cuales, se agruparon cómo ya lo mencionamos con anterioridad en dos subfamilias la D1 y la D2 en donde el receptor D5 por su parecido desde un punto de vista funcional y farmacológico se agrupó junto con el receptor de dopamina D1 quedando conformada entonces la subfamilia D1 like. Por otro lado entonces los receptores D3 y D4 se agruparon dentro de la familia D2 like dadas las características que compartían con los receptores de tipo D2 (Jackson and Westlind-Danielsson 1994).

El receptor de dopamina D2 fue clonado a partir de la rata en 1988 por Bunzon y colaboradores, presenta una secuencia de 415 aminoácidos (Bunzow, Van Tol et al. 1988). Un año después se clonó el receptor en humano por el grupo de trabajo de Dal Toso. Este receptor mostraba una gran similitud con el receptor de la rata, se

encontraron únicamente 18 aminoácidos diferentes entre ambos y un aminoácido menos en el receptor del humano. El gen de este receptor se reportó se encontraba localizado en el cromosoma 11 en la región q22-23 (Jackson and Westlind-Danielsson 1994). Quizá una aportación aún más importante en lo relativo al trabajo de Dal Toso fue que por primera vez sugerían la existencia de dos subtipos de receptores D2 los cuales llamaron D2_A y D2_B, llamados a la postre D2_L y D2_S respectivamente, la característica observada que los hacía diferentes era una falta de 29 aminoácidos en uno de ellos y a los cuales se les atribuían características farmacológicas diferentes (Dal Toso, Sommer et al. 1989).

Los receptores de dopamina D2 se acoplan de manera negativa a la adenilato ciclasa, se propone que el receptor D2 corto causa una inhibición máxima en la formación de AMPc con una dosis inferior a la que requiere el receptor de dopamina D2 largo (Jaber, Robinson et al. 1997). Los receptores D2 se encuentran modulando una gran variedad de procesos fisiológicos, cómo el control del movimiento, el aprendizaje, la emotividad, la presión arterial, sólo por citar algunos. Su utilidad farmacológica se puede explotar en padecimientos de orden neurológico y psiquiátrico, cómo la enfermedad de Parkinson (De Keyser, Walraevens et al. 1989). En el sistema nervioso central estos receptores se encuentran distribuidos principalmente en el núcleo estriado, el tubérculo olfatorio, en la región del core del núcleo *acumbens*, en las neuronas GABAérgicas de estas regiones (Missale, Nash et al. 1998). Estos receptores se localizan principalmente en el pericarion y dendritas en neuronas de la sustancia nigra pars compacta y también se encuentran altamente expresados en una alta densidad en el segmento externo del globo pálido (Levey, Hersch et al. 1993). En 1997 Florán y colaboradores mostraron que tras activar a los receptores de D2 en terminales estriado-palidales se observaba una disminución en la liberación de GABA (Florán, Florán et al. 1997), un efecto que pudiera explicarse por un acople negativo a la adenilato ciclasa cómo lo proponen estudios anteriores que implican la participación de la subunidad α_i .

Vías alternas de señalización del receptor A_{2A} y D2.

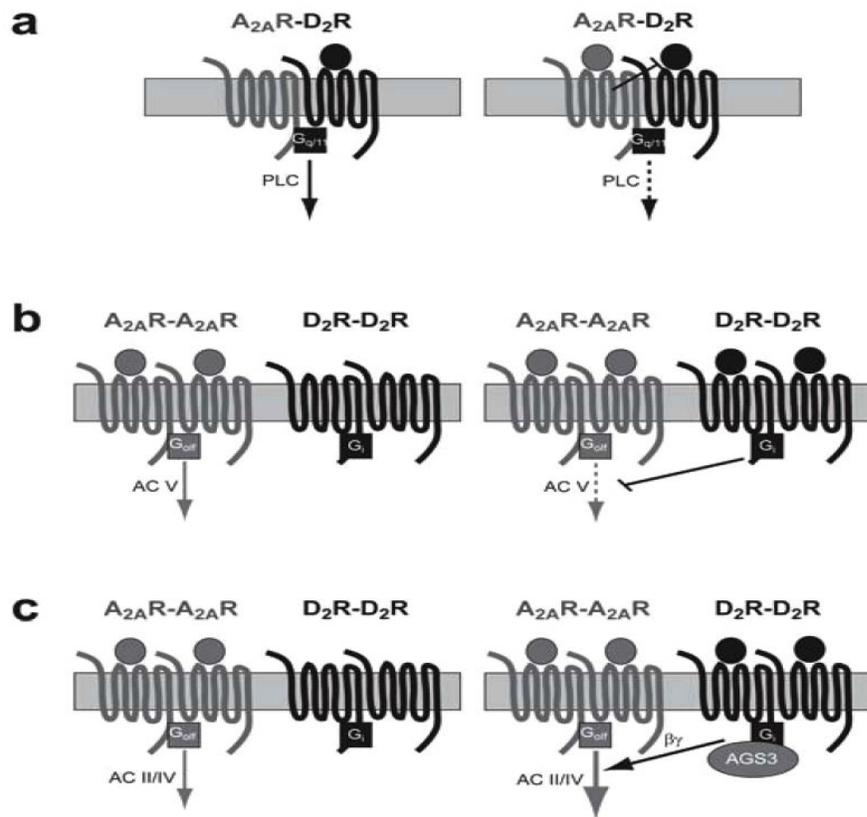
Se ha observado que tras activar a algunos receptores estos pueden activar o inhibir una vía alterna de señalización, esta vía puede ser específica para un núcleo, órgano o tipo celular, en esta revisión vamos a analizar algunos otros mecanismos de transducción de la señal de los receptores A_{2A} y D2. Para el caso de el receptor de adenosina A_{2A} el cual se sabe que en tejido vascular de la arteria caudal de la rata al ser activado puede facilitar la liberación de noradrenalina por la vía de la adenilato ciclasa → AMPc → PKA, pero también por medio de la PLC → PKC (Fresco, Diniz et al. 2004) un efecto que años más tarde se propondría se lograba a través de un acople a una subunidad βγ de una proteína G_{i/o} con la consiguiente activación de la vía PLC → PKC (Fresco, Oliveira et al. 2007).

Por otro lado para el receptor de dopamina D2 se sabe bien este se acopla de manera negativa a la adenilato ciclasa provocando una disminución en la formación de AMPc, así pues también Hernández-López y sus colaboradores en el 2000 demostraron mediante estudios de registro electrofisiológico en el núcleo estriado que la activación de éste receptor produce una disminución en las corrientes de calcio, un efecto modulado por una vía alterna a la adenilato ciclasa, es decir a través de la activación de la PLCβ1 con un subsecuente aumento en la formación de IP3 el cual en respuesta produciría una salida masiva de calcio de los reservorios intracelulares lo que propusieron activaría a la calcineurina y esta a su vez ejercería un efecto modulador sobre los canales de calcio tipo L (Hernandez-Lopez, Tkatch et al. 2000), además se propone que los receptores D2 también podrían estar modulando a los canales de K⁺ (Surmeier, Song et al. 1996, Surmeier, Ding et al. 2007).

Este fenómeno en las vías de transducción de señales de los diferentes receptores puede resultar de interés, en el caso concreto de los receptores de adenosina A_{2A} y de dopamina D2 los cuales ya acotamos con anterioridad y que se sabe en la terminal estriado palidal se encuentran coexpresados, de esta coexpresión en la misma terminal se puede proponer la formación dimérica funcional de este par de receptores, con una implicación en las vías de transducción de sus señales como lo sugiere Ferré en 2008 (Agnati, Ferre et al. 2006) (Figura 3) en donde se plantea que

como resultado de su interacción se modifique la vía “clásica” por la cual cada uno de estos receptores se encuentran señalizando.

Figura 3



Diferentes tipos de interacciones entre el receptor A_{2A} y D₂. a. interacción antagonística entre los receptores A_{2A} y D₂ a través de una G_{q11}-PLC. b. Interacción antagonística a través de una G_{s/olf}-adenilato ciclása. c. Interacción sinergista a través de una G_{s/olf} (tomado de Ferré 2008).

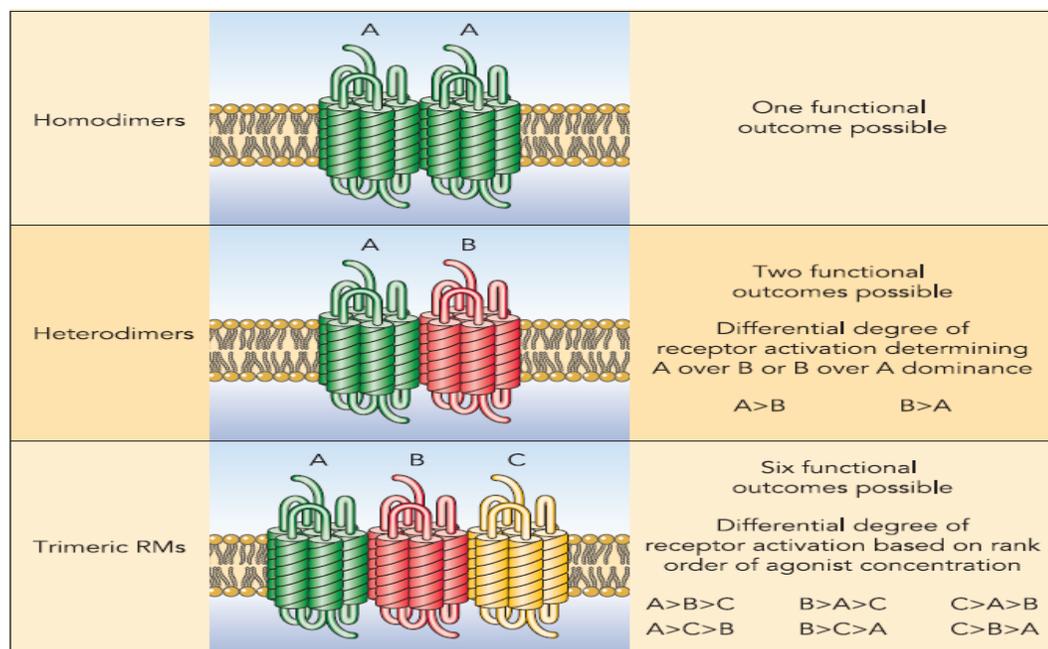
La dimerización entre los receptores acoplados a proteínas G.

Un aspecto relevante en la biología de los receptores acoplados a proteínas G es su capacidad de dimerizar, una característica que a principios de los ochentas se sugirió y en donde se proponía que los receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G podrían interactuar a nivel de la membrana, esto con la finalidad de formar estructuras más estables en la superficie celular (Agnati, Fuxe et al. 1980). Esta habilidad de los receptores de interactuar con otros a la postre se propondría podría tener impacto en el proceso de señalización y transducción de señales o el descubrimiento e instauración de nuevos tratamientos en diversos padecimientos (Orru, Bakesova et al. 2011) (Figura 4). Es un hecho que a pesar de las múltiples herramientas tecnológicas que se tienen en el campo de la investigación molecular, demostrar a plenitud la existencia de una unidad dimérica, trimérica o de más de 3 receptores acoplados es labor exhaustiva y en ocasiones complicada, por este motivo existe una corriente de investigadores que no termina de reconocer la presencia de estas estructuras cómo unidades funcionales, por otra parte haciendo un análisis a conciencia y basándose en estudios cuidadosos y bien planeados se puede afirmar con cierto grado de certidumbre la existencia conformacional y funcional de las unidades heteroméricas.

Existe evidencia previa de que los receptores acoplados a proteínas G pueden formar dímeros, tal vez el ejemplo más antiguo sea el del dímero conformado por diferentes receptores a GABA B, se sabe que es necesario que se encuentren acoplados un receptor GABA_{B1} y un receptor GABA_{B2} para que se pueda observar el efecto fisiológico tras su activación (Emson 2007). Aunada a esta evidencia se propone que no solo estos receptores sino que la gran mayoría de receptores a neurotransmisores podrían estar dimerizando formando una amplia lista en la que se incluye a los receptores a dopamina, los receptores a glutamato, los receptores a canabinoides y desde luego los receptores a adenosina (Ferre, Ciruela et al. 2007, Gurevich and Gurevich 2008). Se proponen mecanismos diferentes por los cuales los receptores a neurotransmisores pueden dimerizar, entre ellos una interacción por enlaces covalente, puentes disulfuro, interacciones por sitios consenso específicos,

interacciones de fuerzas electrostáticas e interacciones a nivel transmembranal, siendo probables más de un tipo de interacción en los diferentes dímeros (George, O'Dowd et al. 2002, Prinster, Hague et al. 2005).

Figura 4



Formación de homodímeros y heterómeros, la base de los mosaicos de diferentes tipos de receptores acoplados a proteínas G y los posibles resultados funcionales de su actividad.

Homodímero: cómo su nombre lo indica se constituye de dos receptores del mismo tipo, el resultado de la activación de esta unidad funcional será entonces la acción “clásica” para este tipo de receptor.

Heterodímero: constituido por dos receptores de diferente tipo, en este caso existe la posibilidad de observar al menos dos respuestas diferentes tras su activación.

Trimero: conformado por tres receptores completamente diferentes, el resultado de esta interacción puede ser muy variado y complejo en función de variables cómo el orden de activación o la concentración de ligandos (tomado de Fuxe 2008).

La existencia de heterómeros en sistemas artificiales es generalmente aceptada, particularmente cuando la existencia de estas unidades es comprobada por experimentos de transferencia de energía por bioluminiscencia y técnicas de

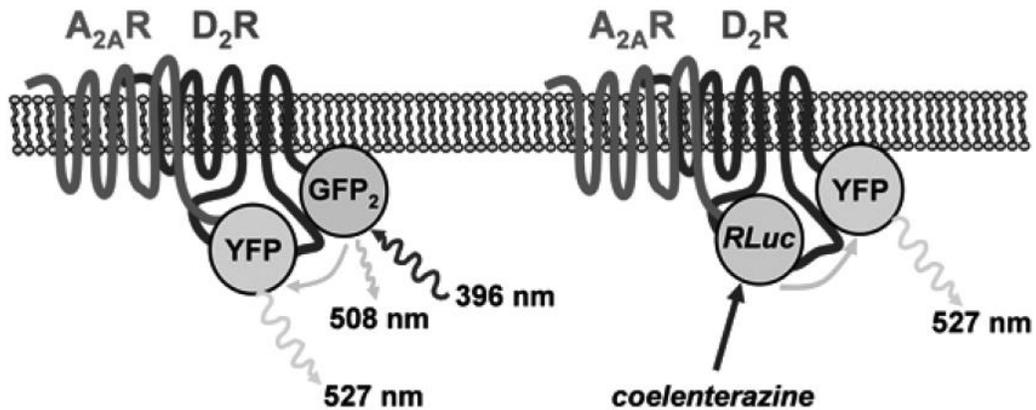
transferencia de energía por fluorescencia, BRET y FRET por sus siglas en inglés (figura 5), estas técnicas luminiscentes hacen posible demostrar la interacción de diferentes proteínas en su medio ambiente natural. Sin embargo, estas técnicas no se pueden aplicar de manera adecuada a los sistemas nativos lo que hace más difícil la demostración de la existencia de los heterómeros teniendo entonces que recurrir a la utilización de pruebas bioquímicas que permitan descubrir características muy específicas de la interacción de los receptores, es decir una huella bioquímica que caracteriza de manera muy particular la interacción de un heterómero un fenómeno conocido como “fingerprint” (Milligan and Bouvier 2005, Pflieger and Eidne 2006).

Hoy en día la demostración de la existencia de heterómeros *in vivo* está cambiando la forma en la que vemos y entendemos la biología de los receptores acoplados a proteínas G abriendo nuevas posibilidades y oportunidades para la intervención terapéutica en diversos padecimientos y modificando los conceptos preestablecidos que tenemos al hablar de estos receptores como las rutas de señalización o los mecanismos de interacción de estos receptores con otras proteínas (Ciruela, Fernandez-Duenas et al. 2012).

El fenómeno de la dimerización entre los receptores A_{2A} y D2.

En 1991 Ferre y colaboradores tras analizar los efectos del receptor A_{2A} sobre la actividad motora en ratones reserpinizados, observaron que la actividad estimuladora de este receptor no se podía explicar simplemente por la acción antagonística de este receptor sobre la actividad del receptor D2 presente también en la terminal estriado-palidal, por lo que propuso que tendría que existir algún tipo de interacción directa entre estos receptores, dicha interacción proponían podría deberse a una relación transmembranal entre ambos receptores y para investigar este fenómeno mediante estudios de unión a radioligandos pudieron determinar en preparaciones membranales de estriado de rata que la activación del receptor A_{2A} podía disminuir la afinidad del receptor de dopamina D2 por su agonista (Ferre, von Euler et al. 1991), sentando con este trabajo las bases para el desarrollo de la teoría de la formación dimérica de este par de receptores.

Figura 5



Técnicas de transferencia de energía por bioluminiscencia (BRET) y técnicas de transferencia de energía por fluorescencia (FRET). Estas técnicas permiten demostrar la formación de heterómeros en sistemas de células vivas. El FRET se obtiene cuando dos proteínas fluorescentes, una que se comporta como donador y la otra como aceptor se encuentran a una distancia aproximada de 10nm. En el BRET en lugar de una proteína donadora fluorescente, alguno de los receptores es unido a una proteína luminiscente (GFP) es utilizada como donadora de energía mientras otra proteína (YFP) es utilizada como aceptora. Si los dos receptores se encuentran formando un dímero el aceptor fluorescente emite una señal que es detectada después de la excitación del donador (tomado de Ferré 2008).

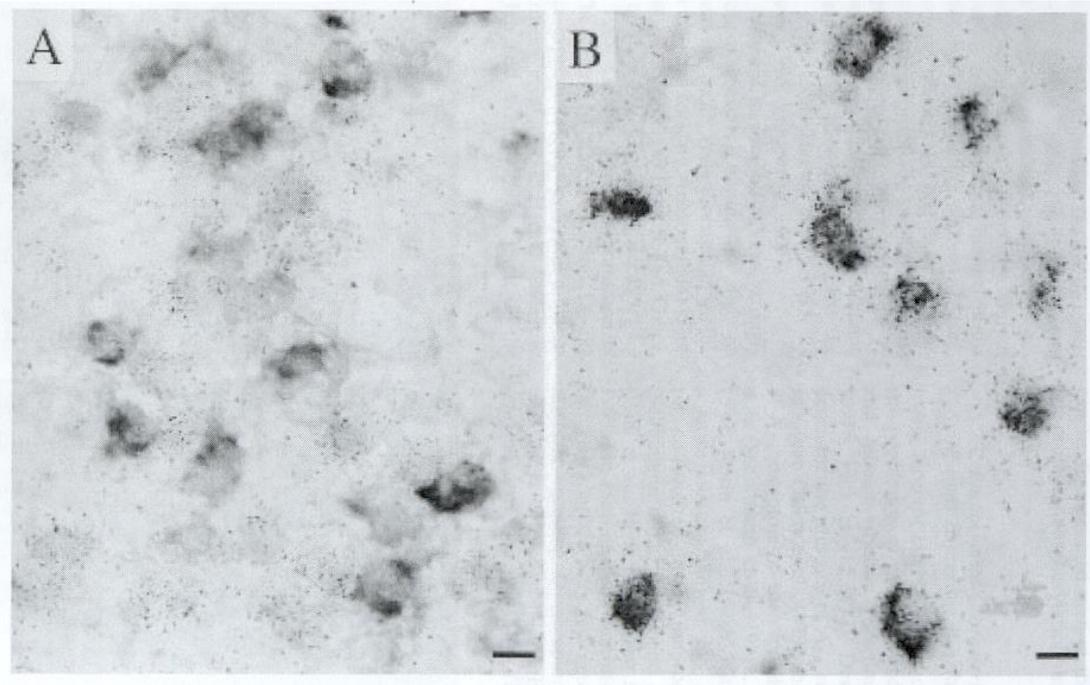
Posteriormente mediante estudios de hibridación *in situ* se demostró que el gen de los receptores A_{2A} se encontraba colocalizado extensamente en neuronas estriado-palidales y positivas a encefalina (figura 6), neuronas que también expresan de manera predominante a los receptores de dopamina D2 (Svenningsson, Le Moine et al. 1997) , estos hallazgos proporcionaron información anatómica que podría ayudar en parte, a explicar cómo los receptores de adenosina A_{2A} modulan la neurotransmisión en neuronas estriado-palidales. En 1993 Mayfield y colaboradores sugerirían que dada la distribución anatómica del receptor A_{2A}, que sabemos está muy circunscrita a ciertas áreas, este patrón de distribución “único” debería jugar un rol

importante en la regulación de la función de los ganglios basales, mediante experimentos de liberación de GABA en rebanadas de globo pálido mostraron que la activación del receptor A_{2A} incrementaba de manera importante la salida del neurotransmisor de la terminal, evidenciando un papel modulador del receptor A_{2A} en el globo pálido que podría representar un mecanismo potencial por el cual las neuronas GABAérgicas de este núcleo liberan su neurotransmisor (Mayfield, Suzuki et al. 1993). Este trabajo podría ayudar al menos en parte a explicar los fenómenos observados por Ferré y colaboradores en 1991 en donde observaron en ratones pretratados con reserpina (un fármaco utilizado para depletar transitoriamente la dopamina endógena) que tras activar al receptor A_{2A} se prevenían los efectos estimulatorios motores que se observaban al activar los receptores D2 (Ferre, Herrera-Marschitz et al. 1991).

En 2005 ya existía una cantidad considerable de literatura que sugería una interacción entre los receptores A_{2A} y D2 sin embargo no se podía explicar de manera clara cuál podía ser el mecanismo por el cual esta interacción se efectuaba, Floran y colaboradores en este año mediante estudios de liberación de GABA radiactivo mostraron que era indispensable que el receptor de dopamina D2 se encontrara activado tónicamente para que los efectos estimulatorios sobre la liberación de este neurotransmisor se pudiera ver incrementado (Floran, Gonzalez et al. 2005), sentando cómo precedente este hecho que incluso podría tener impacto a nivel de la terapéutica de la enfermedad de Párkinson. Por su parte, un año más tarde Antonelli mediante experimentos de microdiálisis en el globo pálido de la rata demostró que el agonista del receptor D2 era capaz de disminuir las concentraciones extracelulares de GABA en dicho núcleo mientras que la activación del receptor A_{2A} con su agonista selectivo no era capaz de modificar los niveles de GABA en el espacio extracelular, pero de manera muy interesante observaron que tras coactivar ambos receptores era posible ver un efecto antagónico sobre la activación de el receptor D2, es decir que se revertía el efecto inhibitorio observado tras la simple activación del receptor de dopamina D2 (Antonelli, Fuxe et al. 2006), una serie de resultados que vendrían a complementar lo antes observado por Floran y colaboradores en 2005 (Floran, Gonzalez et al. 2005). Cómo parte de este intento por establecer la existencia del dímero formado por el

receptor A_{2A} y D2, Fuxe y colaboradores expondrían en una revisión basada en los hallazgos encontrados hasta la fecha que las evidencias a nivel funcional y anatómico eran funcionalmente relevantes y que ocurrían en la misma neurona y que cumplían con una serie de requisitos que permitían afirmar la formación de dicho dímero (Fuxe, Ferre et al. 1998).

Figura 6



Los receptores A_{2A} se coexpresan en neuronas encefalinérgicas de la vía estriado-palidal. A. Micrografía de neuronas dinorfinérgicas en las que se observa el receptor A_{2A} (puntos negros) no se encuentra coexpresado. **B.** Micrografía de neuronas encefalinérgicas en donde los receptores A_{2A} se encuentran coexpresados (modificado de Svenningsson 1997).

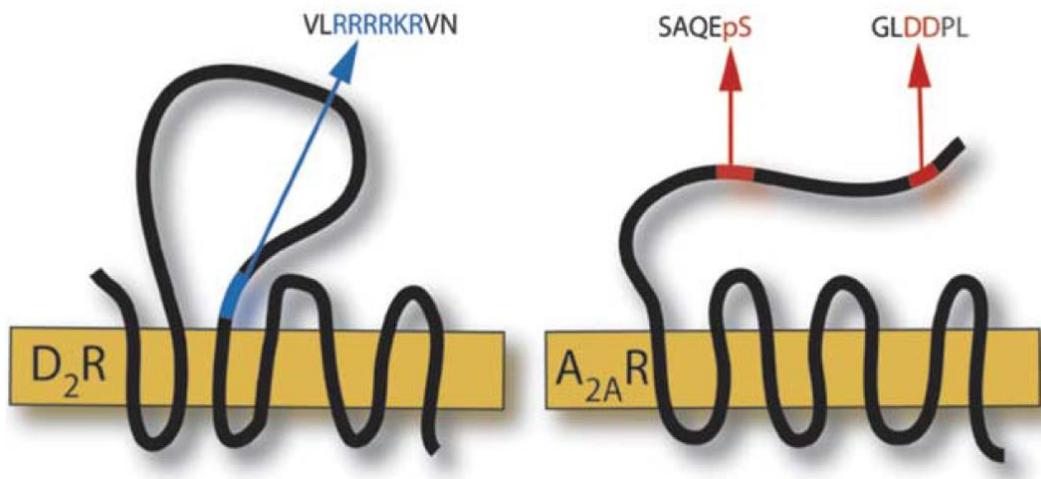
Mecanismos moleculares y efectos funcionales de la interacción del dímero A_{2A}/D2.

Como parte del proceso de entender cómo es que estos dos receptores se encuentran interactuando, se podría decir que existen dos vertientes en la que se ha trabajado, una de ellas es tratar de entender los eventos moleculares que terminan en un aumento en la liberación del neurotransmisor en la terminal y por otra parte dilucidar la naturaleza de la interacción entre dichas proteínas.

Cómo ya se mencionó previamente el receptor A_{2A} tiene una característica distintiva, su largo dominio C-terminal, esto le confiere la posibilidad de interactuar con otros receptores, particularmente con el receptor D2 en la terminal estriado palidal en donde se sabe se encuentran colocalizando; en 2003 Cannals y colaboradores mediante experimentos de transferencia de energía en cotransfectos de células HEK demostrarían que ambos receptores se encontraban a una distancia no mayor de 6.3 nm y que esta interacción podría ser a nivel del dominio C-terminal del receptor A_{2A} y el asa cinco y seis del receptor D2 esto último sugerido con base en los resultados obtenidos por Gordon y colaboradores en 1996 donde se mostraba que el receptor D2 podía interactuar con el receptores D1 en este segmento, un resultado que tendría mucha relevancia en vista de el gran parecido estructural que existe entre el receptor A_{2A} y el receptor D1 (Ng, O'Dowd et al. 1996, Canals, Marcellino et al. 2003). Posteriormente se demostraría que existe un segmento del dominio C-terminal del receptor de adenosina con una carga positiva conformada por nueve aminoácidos, ³⁷⁰SAQESQGNT siendo determinante en esta secuencia para la interacción con el receptor D2 la serina 374, por su parte se demostró también que la tercer asa intracitoplásmica del receptor D2 en su segmento 370-378, un segmento rico en arginina, ²¹⁵VLRRRRKRVN₂₂₄ es el sitio consenso para la interacción (Ciruela, Burgueno et al. 2004) (Figura 7). Fuxe en 2009 describiría esta interacción como una interacción electrostática de tipo covalente entre el epítipo rico en arginina altamente conservado (motivo básico) encontrado en el tercer loop o asa intracitoplásmica del receptor D2 y el residuo serina/treonina fosforilado (motivo ácido) en el dominio C-

terminal del receptor A_{2A} y un enlace no covalente cuando el residuo treonina serina del dominio C-terminal se encuentra fosforilado (Ciruela, Burgueno et al. 2004, Fuxe, Marcellino et al. 2009, Fernandez-Duenas, Gomez-Soler et al. 2012). Es de esperar que el resultado de dicha interacción no se deba únicamente a la relación de estos dos epítopes, se propone que al menos en cierta medida puedan estar involucrados otros dominios transmembranales que contribuyan a la conformación cuaternaria del dímero (Ferre, Woods et al. 2010). El impacto de dicha interacción sería comprobada a la postre por Borroto-Escuela mediante experimentos de transferencia de energía (Borroto-Escuela, Romero-Fernandez et al. 2010). Así también se pondría de manifiesto que la coactivación de este par de receptores resulta en una coagregación, cointernalización y codesensibilización con la participación de la proteína β-arrestina sumándose estos resultados a la creciente lista de evidencia de la interacción de estos receptores (Hillion, Canals et al. 2002, Borroto-Escuela, Romero-Fernandez et al. 2011).

Figura 7



Sitios de interacción entre el receptor A_{2A} y D₂. La tercer asa intracitoplásmica del receptor D₂ en su segmento aa215 a 224 un dominio rico en arginina interactúa con dos porciones de la porción C-terminal del receptor de adenosina A_{2A} (tomado de de Ferre 2004).

Tras analizar todos estos resultados se podría tomar en cuenta la teoría que postula Agnati y colaboradores en 2008 en la cual se propone que los receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G pueden ser considerados como proteínas multidominios en donde varios de estos dominios pueden encontrarse interconectados en el medio intracelular, extracelular o transmembranal y que estos receptores pueden estar formando sobre todo en la terminal estriado palidal con implicaciones funcionales, una serie de grupos o clusters que también podrían ser considerados mosaicos (Figura 8) y que se definen como sigue:

- Un mosaico o cluster se considera como tal sólo si alguno de los receptores modula las características bioquímicas del otro receptor en el mosaico.
- Cada receptor responderá a su ligando en una manera que dependa no solo de su propia conformación, sino también de la interacción con el otro receptor de el complejo macromolecular.

Visto desde esta óptica proponen entonces, que estos receptores funcionan como unidades integradoras con propiedades emergentes que dependen de su topología en el mosaico e incluso su orden de activación (Agnati, Fuxe et al. 2008, Agnati, Leo et al. 2008, Agnati, Guidolin et al. 2010) un fenómeno que cómo ya revisamos no es ajeno al dímero A_{2A} -D2 y que en muchos aspectos ajusta perfecto a este modelo.

Cómo otro apartado relativo a la interacción de ambos receptores esta el mecanismo por el cual ambos se encuentran señalizando, es decir la vía de transducción de señales, en este rubro hasta el momento se tienen varias teorías que no dejan de ser estimados de lo que podría estar ocurriendo, particularmente en la terminal estriado palidal como analizaremos a continuación.

Ya hemos revisado el mecanismo de acción del receptor A_{2A} el cual se acopla de manera positiva a la adenilato ciclasa mediante una proteína $G_{s/olf}$, generando un aumento en la ruta del AMPc-PKA, la fosforilación de diferentes substratos de la PKA, como DARP-32, CREB y los receptores AMPA con el consecuente aumento en la expresión de diferentes genes como c-fos o preproencefalina en la neurona GABAérgica (Ferre, Fredholm et al. 1997, Agnati, Ferre et al. 2003, Ferre, Ciruela et

Para explicar estos fenómenos existen al menos dos posibilidades que incluso podrían no ser excluyentes una de la otra, por una parte la posibilidad del acople por parte del receptor D2 a una proteína G diferente a la que se acopla clásicamente, cómo ocurre cuando este receptor forma heterómeros con el receptor D1, en donde este se acopla a una proteína de tipo $G_{q/11}$ -PLC (Rashid, So et al. 2007), una situación que podría no ser tan improbable ya que estructural y funcionalmente el receptor A_{2A} y el receptor D1 son similares, pues ambos tienen un tercer dominio intracitoplásmico corto y un muy largo dominio C-terminal además de que ambos se acoplan a una proteína G estimuladora en el núcleo estriado. Además de que también utilizan un epítipo muy parecido para interactuar con el receptor de dopamina D2 (Woods and Ferre 2005). Además en abono de esta idea se sabe que el efecto inhibitorio del receptor D2 sobre las corrientes de calcio a través de canales dependientes de voltaje tipo L en neuronas encefalinérgicas depende de la activación de la vía $G_{q/11}$ -PLC (Hernandez-Lopez, Tkatch et al. 2000).

Otra posibilidad se encuentra en la característica de el dominio C-terminal del receptor A_{2A} el cual podría estar interactuando en el epítipo específico para el receptor D2 el cual a su vez se encontraría incapacitado para interactuar con su proteína G inhibitoria dejando como única opción a este dominio C-terminal para interactuar con su proteína G prototípica es decir una proteína $G_{s/olf}$ (Ferre, Quiroz et al. 2008). Con estas dos posibilidades se podría explicar el mecanismo por el cual estos receptores tras ser coactivados ejercen su efecto descrito.

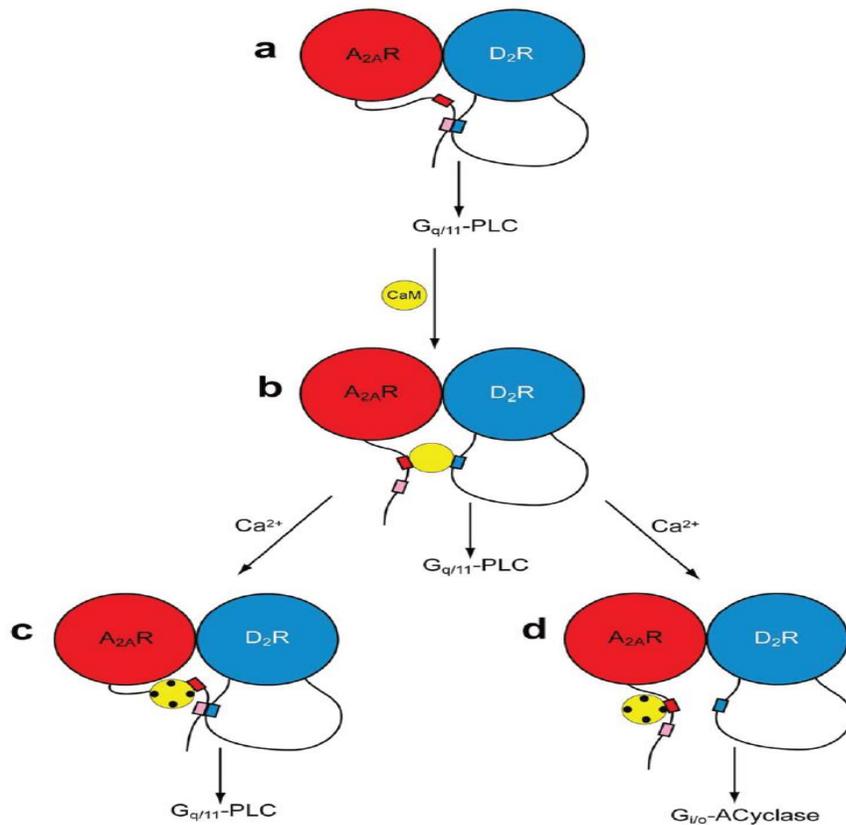
Una tercera posibilidad que se podría tomar en cuenta para poder explicar el mecanismo de acción de estos receptores recae en la calmodulina (CaM) una proteína unidora de calcio de 17 kDa, altamente expresada y conservada en el medio intracelular, esta proteína se considera un mediador importante de las señales en organismos multicelulares. Estudios recientes ha revelado que esta proteína puede estar interactuando directamente con receptores acoplados a proteínas G y que los resultados de esta interacción pueden ser muy diversos (Wang, Sadee et al. 1999, Vetter and Leclerc 2003). Un ejemplo de esto es la interacción que se da entre esta proteína y los receptores de opioides los cuales al interactuar con la CaM mediante su tercer asa intracitoplásmica disminuyen su interacción con su proteína G (Wang,

Sadee et al. 1999). En el caso concreto del receptor a dopamina D2 se sabe que la CaM interactúa con el tercer dominio intracitoplásmico de este receptor justamente en la región rica en arginina que utiliza para interactuar con el receptor A_{2A}, en este sistema al aumentar la interacción entre la CaM y el receptor D2 se observa una disminución de la interacción con su proteína G (Bofill-Cardona, Kudlacek et al. 2000). Woods y colaboradores proponen que la interacción electrostática de la CaM con el receptor D2 y el receptor A_{2A} puede tener implicaciones importantes para la función del heterómero, primero que nada porque la CaM se puede unir simultáneamente a ambos receptores, además de que los receptores A_{2A} pueden utilizar mecanismo dependientes de la CaM para interactuar con el receptor D2, en otras palabras, las CaM podría funcionar como un mecanismo indirecto para unir a ambos receptores, es decir cómo un switch. Resultado de esta interacción el receptor D2 podría quedar incapacitado para señalizar por medio de su proteína G_{i/o} cuando se une al receptor A_{2A} y a la CaM ya que se sabe es fundamental que el receptor D2 se acople a su proteína G mediante su tercer asa intracitoplásmica, misma entidad que utiliza para interactuar con el heterómero. Finalmente en este trabajo se postula que la CaM podría estar gobernando un cambio en la vía de señalización del dímero dependiendo de las concentraciones de calcio, a través de la vía G_{q/11}-PLC ó G_{i/o}-adenilato ciclasa (Woods, Marcellino et al. 2008, Ferre, Woods et al. 2010). Una propuesta que podría ser soportada con base en evidencia en estudios de transferencia de energía en donde se observó que dependiendo de las concentraciones de calcio dentro de la célula las interacciones y el estado conformacional del heterómero estarían gobernadas por la relación establecida entre ambos receptores, el estado de activación de las CaM y la cantidad de calcio presente (Navarro, Aymerich et al. 2009) (Figura 9).

Por otra parte, se ha observado también que otras proteínas unidoras de calcio relacionadas estructuralmente con la calmodulina pueden interactuar directamente con receptores acoplados a proteínas G, en este caso la NCS-1 puede interactuar con el receptor D2 en donde resultado de esta interacción se inhibe la fosforilación del dominio C-terminal de esta proteína con una subsecuente disminución en la internalización del receptor (Kabbani, Negyessy et al. 2002). Así también esta misma

proteína NCS-1 puede interactuar con los receptores A_{2A} a nivel de su dominio C-terminal generando cambios conformacionales en el heterómero con consecuencias en las vías de señalización intracelulares inducidas por agonistas (Navarro, Hradsky et al. 2012).

Figura 9



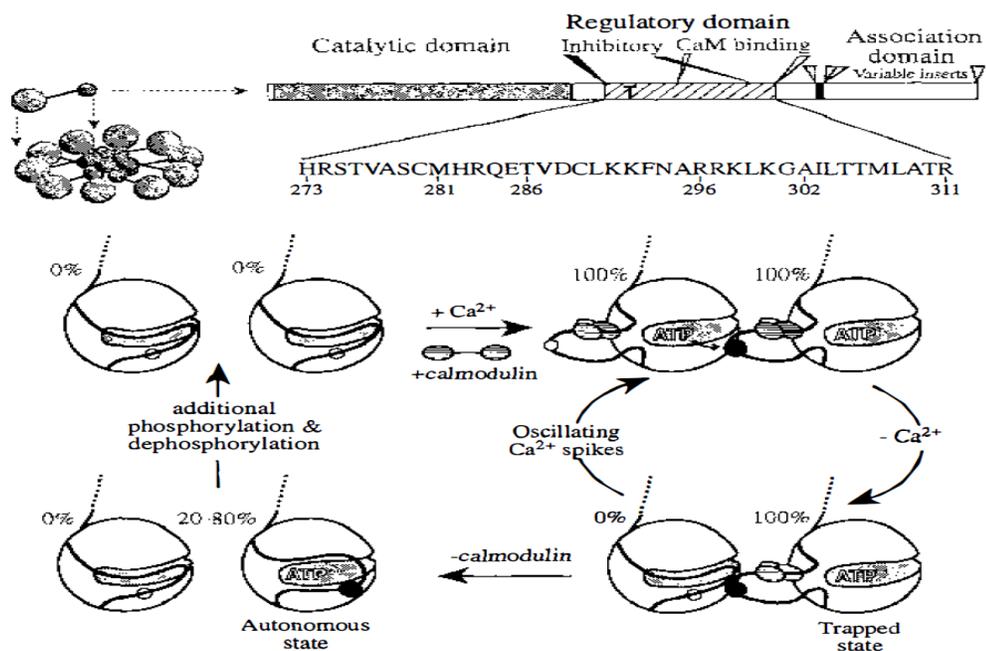
Posibles interacciones funcionales entre la CaM y el receptor A_{2A} y entre la CaM y el receptor D₂ **a.** interacción del dímero en ausencia de CaM, **b.** una idea que propone la calmodulina funciona como un puente entre el receptor A_{2A} y D₂. **c y d.** la presencia de la CaM activada por cuatro moléculas de calcio puede modificar la vía de señalización del dímero (tomado de Woods 2008).

La CaMKII y los receptores acoplados a proteínas G.

Cómo punto final en lo que toca al análisis molecular de las interacciones entre ambos receptores y sus vías de señalización, es pertinente abordar la participación de la CaMKII, una cinasa dependiente de calcio/calmodulina, de expresión ubicua en las células y llamada así por requerir de manera indispensable la unión del complejo de la calmodulina activada por cuatro moléculas de calcio. Una vez activada esta enzima es capaz de fosforilar múltiples substratos modificando su función o estado basal (Braun and Schulman 1995). La familia de la CaMKII está constituida por cuatro clases de cinasas (α , β , γ y δ) codificadas cada una de ellas por un gen diferente. Las del tipo α y β se encuentran restringidas únicamente al tejido del sistema nervioso central, mientras que la γ y δ se encuentran expresadas en la mayoría de los tejidos incluyendo el cerebro (Tobimatsu and Fujisawa 1989). Esta proteína se divide en tres dominios, el N-terminal o dominio catalítico, el C-terminal o dominio de asociación y un dominio central autorregulatorio (Braun and Schulman 1995, Hudmon and Schulman 2002) (Figura 10). La protein fosfatasa 1, 2a y 2c además de la protein cinasa fosfatasa dependiente de Ca^{2+} /CaM pueden contribuir a la desfosforilación en el sitio treonina 286 de la CaMKII disminuyendo con esto su actividad, además se ha documentado que la misma CaMKII se puede autodesfosforilar a altas concentraciones de ADP y ATP (Ishida, Kameshita et al. 1998, Kim, Hudmon et al. 2001). A la CaMKII se le ha descrito cómo una cinasa cognitiva debido a su participación en la regulación en procesos de aprendizaje, se estima que la CaMKII conforma el 2% del total de las proteínas del hipocampo, un área altamente involucrada en los procesos de aprendizaje y memoria (Erondu and Kennedy 1985). Un ejemplo de modulación de receptores acoplados a proteínas G por parte de la CaMKII es el receptor de dopamina D3 el cual se expresa de manera importante en áreas mesolímbicas de proyección dopaminérgica, incluyendo en núcleo acumbens, en donde se sabe ejerce una función significativa en procesos de motivación, recompensa, aprendizaje y emotividad (Sokoloff, Giros et al. 1990, Bouthenet, Souil et al. 1991), esta interacción se establece directamente con el tercer dominio intracitoplásmico de manera dependiente de Ca^{2+} . Esta interacción permite a la

CaMKII fosforilar al receptor D3 de la sustancia *nigra*, teniendo un impacto funcional en la actividad dependiente del receptor, toda vez que es bien sabido es el tercer asa intracelular el responsable de acoplarse a su proteína $G_{i/o}$ (Liu, Mao et al. 2009). Por otra parte, existe evidencia de que la CaMKII también puede modular la actividad de unidades heterodiméricas funcionales cómo lo plantea Avalos-Fuentes y colaboradores en donde la activación de la CaMKII previene los efectos potenciadores del receptor D3 sobre en D1 en su interacción dimérica. Analizando estos hechos se podría pensar que el heterodímero conformado por el receptor A_{2A} y D2 también pueden estar bajo el control de la cinasa de calmodulina como efector de la calmodulina interactuante con el dímero (Avalos-Fuentes, Loya-Lopez et al. 2013).

Figura 10



Estructura de la cinasa de calmodulina. CaMKII. Esta proteína se conforma por tres dominios uno catalítico, otro de asociación y el dominio regulatorio. La CaMKII pasa de un estado inactivo a un estado de activación cuando se une a ella la calmodulina activada por cuatro moléculas de calcio (tomado de Braun 1995).

La evidencia funcional de la interacción entre ambos receptores es abundante, se propone una relación antagonista entre el receptor A_{2A} y D2, una primera evidencia de esto es el trabajo que ya citamos con anterioridad en donde se encontró que la estimulación de los receptores A_{2A} reduce la unión del receptor D2 a su ligando, además de que se sabe la activación del receptor D2 inhibe la formación de AMPc y disminuye la liberación de GABA en la terminal estriado-palidal mientras el receptor A_{2A} la estimula la formación de AMPc y estimula la liberación de GABA en dicha terminal, son probablemente, estos fenómenos la base de los efectos observados en experimentos de conducta motora (Ferre, von Euler et al. 1991, Dayne Mayfield, Larson et al. 1996, Ferre, Fredholm et al. 1997).

Esta relación y los resultados que acabamos de mencionar aparecieron a la postre de trabajos publicados por Snyder en 1981 y Barraco en 1983 en donde se podía observar que la administración de un agonista a las metilxantinas por vía sistémica o central producía una disminución de la movilidad en ratones y que a su vez la coadministración de un antagonista prevenía los efectos inhibitorios, un efecto que se proponía podría ser explicado a través de una interacción del sistema adenosina/dopamina dada la participación conocida de la dopamina en el control del movimiento a nivel de sistema nervioso central (Snyder, Katims et al. 1981, Barraco, Coffin et al. 1983, Phillis, Barraco et al. 1986). En 1991 un par de trabajos realizados por Ferré y colaboradores mediante experimentos con ratones reserpinizados encontraron que al administrarles bromocriptina era posible observar una reactivación de la movilidad, esta reactivación entonces se proponía podría deberse a la activación del receptor a dopamina D2 postinápticos ya que este efecto estimulador desaparecía al coadministrar el antagonista no selectivo D2, sulpiride. Para poner en el panorama al receptor de adenosina A_{2A} en este par de trabajos se observó que la teofilina, un antagonista para receptores a metilxantinas con mayor afinidad al receptor A_{2A}, al ser administrado en ratones pretratados con reserpina restablecía la capacidad motora que se perdía al depletar de dopamina endógena con el pretratamiento, además de que la administración de un agonista del receptor A_{2A} de manera concomitante con un agonista del receptor D2 dejaba nuevamente al ratón pretratado en un estado de inmovilidad (Ferre, Herrera-Marschitz et al. 1991, Ferre, Herrera-Marschitz et al.

1991). Con base en estos trabajos se sugeriría quizás por primera vez la existencia de una interacción de los receptores $A_{2A}/D2$ a nivel postsináptico, una interacción que hasta ese momento se proponía podría ser a nivel del núcleo estriado o acumbens. Estudios de registro electrofisiológico en estriado de rata mostraron que el quinpirol, un agonista de los receptores D2 producía una disminución en la actividad neuronal y que este efecto se veía potenciado al coadministrar un antagonista del receptor A_{2A} , el MSX-3 (Stromberg, Popoli et al. 2000), así también se pudo observar que en un modelo de catalepsia y movimientos de masticación en vacío inducidos por un antagonista de los receptores de dopamina, el haloperidol, dichos efectos podían ser prevenidos completamente por un antagonista del receptor A_{2A} , en este caso el KF17837 (Correa, Wisniecki et al. 2004). Lo mismo ocurría en otro modelo de catalepsia en donde se observaba mediante una prueba de barra en donde la rata tras ser tratada con sulpiride, un antagonista D2 o SCH23390, antagonista D1, ambos fármacos para producirle catalepsia, el tiempo que la rata mantenía sus extremidades anteriores se incrementaba en comparación con el grupo control, dicho efecto era revertido por un antagonista del receptor A_{2A} (Hauber, Neuscheler et al. 2001). Son numerosos los trabajos que documentan que la inactivación del receptor A_{2A} puede revertir los efectos catalépticos en modelos animales y es que gracias a estos hallazgos se proponga la potencial aplicación de antagonistas de este receptor como coadyuvante en la terapéutica de la enfermedad de Parkinson (Salamone, Betz et al. 2008, Salamone, Ishiwari et al. 2008).

Planteamiento del problema:

Como ya hemos analizado en la revisión de la bibliografía, existe evidencia que apoya la idea de que los receptores A_{2A} y D2 pueden formar una unidad dimérica, esto principalmente en sistemas de expresión heteróloga, sin embargo, a la fecha no se tiene evidencia que apoye de la existencia de esta interacción a nivel proteína-proteína en la terminal estriado-palidal, los resultados encontrados con prelación indican claramente que existe una relación funcional entre estos receptores, por lo que esclarecer si estos se encuentran interactuando de manera semejante a como lo hacen en sistemas no nativos representaría un avance en la comprensión de esta interacción.

Por otra parte mucho se ha especulado en la ruta de señalización que acontece tras la activación de ambos receptores y que como resultado final implica una salida importante de GABA de la terminal estriado-palidal, consideramos es necesario esclarecer la vía de transducción de señales de esta unidad dimérica y además determinar si esta se encuentra bajo la influencia de otros mensajeros como la calmodulina o la cinasa de calmodulina tipo II.

Dada la posible implicación terapéutica del dímero en cuestión sería de gran interés determinar si la interacción que se plantea existe entre ambos receptores se mantiene en condiciones de Parkinson experimental y de ser así, si se ve modificada o no la ruta de señalización.

Hipótesis:

La coactivación de receptores A_{2A} y D2 estimula la liberación de GABA en el globo pálido a través de la vía de señalización AMPc \rightarrow PKA, en condiciones normales y de Parkinson experimental. Estos receptores a nivel de las terminales pueden dimerizar y su actividad está mediada por la CaMKII.

Objetivo general:

Entender la interacción dimérica de los receptores A_{2A}/D_2 en el globo pálido, sus efectos sobre la transmisión GABAérgica pálidal en condiciones normales y de Parkinson Experimental y el control por la CaMKII.

Objetivos específicos:

1. Determinar si los receptores A_{2A} y D2 en condiciones normales y en la denervación dopaminérgica pueden formar un heterodímero.
2. Determinar la vía de señalización involucrada en los efectos de la coactivación de receptores A_{2A}-D2 en condición normal y de parkinson experimental, Adenilato ciclasa →AMPc→PKA, PLC → PKC ó PLC→IP3.
3. Estudiar los efectos de la coactivación de los receptores A_{2A}-D2 sobre la liberación de GABA en el globo pálido en condiciones normal y de Parkinson experimental.
4. Determinar el efector final (canal de calcio) en los efectos de la coactivación para el control de la liberación de GABA.
5. Estudiar el papel de la CaMKII en la interacción A_{2A}-D2 sobre la liberación de GABA.

Material y métodos

Sujetos experimentales:

En todos los experimentos se emplearon ratas macho de la cepa Wistar, con un rango de peso de 200-230 gramos, las cuales fueron mantenidas en condiciones controladas hasta la realización de los experimentos: Alimento y agua *ad libitum*, ciclos luz/oscuridad de 12 horas cada uno y temperatura $20\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Lesión dopaminérgica con 6-OHDA:

Para generar el modelo de lesión con 6-hidroxidopamina se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de aproximadamente 200 a 220 gramos de peso. Las ratas fueron tratadas con desipramina 40 minutos previos a la lesión a una dosis de 10mg/kg por vía intraeritoneal para prevenir la lesión de neuronas noradrenérgicas. Para el manejo de los sujetos experimentales se siguieron los protocolos de la guía de cuidado de animales de laboratorio aprobada por el comité institucional de cuidado animal de CINVESTAV. Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina y xilazina a una dosis de 75mg por kilogramo y 10mg por kilogramo, respectivamente. Una vez comprobado un plano de analgesia/anestesia adecuada para la cirugía las ratas fueron colocadas en un equipo estereotáxico David Kopf, mediante una incisión caudal a λ y en dirección caudo-craneal sobre la sutura medial del cráneo y debridado de la piel se logró tener acceso a los huesos craneanos.

Una vez localizada la bregma con la ayuda de un microscopio estereoscópico se realizó una trepanación hemilateral en el hueso parietal izquierdo basándose en las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (-1.8 anterior, 2.4 lateral y -7.0 milímetros

ventral) para inyectar la toxina en el haz del cerebro medio (Paxinos 2006). La toxina fue inyectada con una mezcla de 16µg/µL y ácido ascórbico al 0.1%.

Ocho días posterior a la lesión se realizó una prueba de giro para evaluar el grado de lesión dopaminérgica en las ratas, la prueba se realizó administrando metanfetamina por vía intraperitoneal a una dosis de 10mg/kg, sólo las ratas con más de 10 giros por minuto fueron consideradas para los experimentos (Rangel-Barajas, Silva et al. 2008).

Disminución de dopamina endógena mediante el tratamiento con reserpina:

En los experimentos en los que era necesario depletar la dopamina endógena en las ratas, se administró reserpina un inhibidor del transportador vesicular de monoaminas (VMAT) por vía subcutánea 16 horas antes de los experimentos a una dosis de 10mg/kg como lo proponen Nava y colaboradores en 2007 (Nava-Asbell, Paz-Bermudez et al. 2007). La reserpina se solubilizó en una mezcla de ácido láctico y agua para hacerla adecuada para su administración, 18 horas después de la administración de reserpina para la utilización de los animales se verificó que estos manifestaran los signos clásicos de la disminución dopaminérgica, es decir hipomotilidad, letárgia y piloerección.

Experimentos de liberación de [³H]GABA:

En los experimentos de liberación de GABA radiactivo se utilizaron rebanadas de globo pálido, estas se obtuvieron mediante una rápida decapitación de las ratas y obtención del cerebro, una vez extraído el cerebro este se depositó en una placa de metal enfriada por una base de hielo, con la finalidad de preservar la integridad de el tejido y de endurecerlo para facilitar su microdissección. Ya frío el tejido cerebral este fue pegado a una caja de pétri la cual se llenó con solución

cerebroespinal artificial [NaCl107.5mM, KCl3mM, MgSO4 1mM, KH2PO4 1.2 mM, CaCl2 1.8mM, NaHCO3 16.5 mM, Glucosa 11mM] a un pH de 7.4.

Tras la inclusión del tejido en la caja de pétri se realizaron rebanadas de 300µm de espesor, las rebanadas se mantuvieron en la solución cerebroespinal artificial a -4°C y con un burbujeo constante con una mezcla de O₂/CO₂ (95%/5%). Concluida la disección las rebanadas fueron cambiadas a una solución cerebroespinal artificial a 37°C y burbujeo constante y se dejaron estabilizar durante 30 minutos. Ya estabilizadas las rebanadas se marcaron con [³H]GABA a una concentración de 2X10⁻⁸ M con una actividad específica de 95 Ci/nmol y se dejaron 30 minutos más en esta solución para permitir la incorporación del material radiactivo al interior de la terminal. Luego de las rebanadas con el GABA radiactivo se retiró el exceso de marca mediante tres lavados con líquido cerebroespinal y ácido nípcótico a una concentración de 10µM esto con la finalidad de evitar la recaptura del GABA marcado.

Las rebanadas de globo pálido ya incubadas con [³H]-GABA, fueron transferidas a cámaras de perfusión acopladas a un colector de fracciones, donde se trataron con los fármacos a estudiar para cada condición experimental. Las cámaras fueron perfundidas de forma constante con solución fisiológica a 37°C con burbujeo constante, a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. Después de un periodo de estabilización y de un lavado de 20 minutos, se colectaron 4 fracciones de 4 minutos cada una de liberación basal (16 minutos), posteriormente se aplicó un pulso despolarizante de alto K⁺ [NaCl 107.5mM, KCl 15mM, MgSO4 1mM, KH2PO4 1.2mM, CaCl 1.8mM, NaHCO3 16.5mM), Glucosa 11mM] a un pH de 7.4 para inducir la liberación de [³H]-GABA por despolarización de la terminal, elevando las concentraciones de K⁺ de 3mM a 15mM durante 24 minutos, logrando la colecta de 6 fracciones más. Los fármacos fueron perfundidos 2 fracciones antes del pulso despolarizante con alto K⁺ y durante la duración del mismo, en los grupos indicados. En cada experimento se tomaron 20 muestras en paralelo, para cada caso experimental se hicieron cuando menos 4 experimentos, con mínimo de 3 réplicas de cada uno. Al término de cada experimento, las rebanadas fueron extraídas de las

cámaras de perfusión y les fue adicionado 1 ml de HCl 1N, con el fin de desintegrar la membrana y cuantificar la radioactividad remanente en el tejido.

Por último las fracciones colectadas, fueron colocadas en un contador de centelleo líquido para medir la radioactividad liberada por cada fracción, expresada como el cociente de la radioactividad presente por fracción / la radioactividad presente en el tejido(Aceves, Floran et al. 1995, Floran, Floran et al. 1997).

$$F. R. = \frac{R. P. F}{R. P. T}$$

Una vez obtenido el F.R. se gráfico entre los diferentes grupos experimentales, para evaluar la magnitud del efecto de los fármacos se determinó el área bajo la curva de las curvas de liberación y se graficó en forma de barra para una visualización más didáctica y un análisis estadístico simple (Aceves, Floran et al. 1995, Floran, Floran et al. 1997).

Obtención de sinaptosomas:

Para la obtención de los sinaptosomas de la terminal estriado-palidal se utilizaron rebanadas de globo pálido de 300µM de espesor las cuales se obtuvieron de la misma manera que cuando se hicieron los experimentos de liberación de GABA y que acabamos de revisar en el método anterior, tras la disección de las rebanadas estas fueron cambiadas a una solución Hepes-sacarosa [.32M] y homogenizadas para posteriormente por medio de una primera centrifugación a 800g durante 10 minutos y refrigeración separar los compuestos celulares más pesados, como organelos dejando dos fracciones, una superior con una mayor proporción de membranas celulares y una porción inferior con mayor cantidad de organelos. El sobrenadante entonces fue recuperado y nuevamente centrifugado a 20000g durante 30 minutos para obtener una pastilla o botón el cual fue conservado y resuspendido de nueva cuenta en 2 mL de solución Hepes-sacarosa [.32M], para obtener el purificado final mediante un

gradiente de solución Hepes-sacarosa [.8M] y la fracción resuspendida en Hepes-sacarosa [.32M] se centrifugó de nueva cuenta la muestra a 20000g durante 30 minutos obteniéndose una pastilla o botón la cual fue resuspendida de nueva cuenta para los experimentos de formación de segundos mensajeros o experimentos de inmunoprecipitación y/o westernblot.

Experimentos de acumulación de AMPc:

Para los experimentos de acumulación de AMPc se utilizaron sinaptosomas de globo pálido incubados durante 60 minutos en 3 ml de Krebs-HEPES (pH 7.4) a 37°C más [³H]adenina [130nM] (3μCi/ml). Posterior a la incubación con tritio adenina la muestra fue centrifugada durante 5 minutos a 11000g, se desecho el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en Krebs-HEPES con un inhibidor no específico de las fosfodiesterásas de AMPc, 1-Methyl-3-isobutylxanthine, 3,7-Dihydro-1-methyl-3-(2-methylpropyl)-1*H*-purine-2,6-dione, 3-Isobutyl-1-methyl-2,6(1*H*,3*H*)-purinedione, IBMX [50mM]. Para la activación de los sinaptosomas con los diferentes tratamientos se agregaron los diferentes fármacos en alícuotas de 10 μL y aforados a 250 μL en tubos de policarbonato. Las muestras se dejaron reaccionar en baño maría a 37 °C durante 10 minutos y en agitación constante, es importante resaltar que cada condición experimental se conformó por al menos cuatro réplicas o muestras y un mínimo de 4 repeticiones de cada experimento para el análisis estadístico. Transcurrido el tiempo de incubación de los sinaptosomas con los tratamientos la reacción se detuvo con 100 μl de una solución de paro [4.5mM de AMPc, 2.5 mM ATP y 6% de TCA] enfriada en baño de hielo. Las muestras fueron sometidas a congelación durante 20 minutos para terminar con toda actividad enzimática y metabólica de los sinaptosomas.

Después del tiempo de congelación las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que se descongelaron, se centrifugaron a 11000g durante 10 minutos, el sobrenadante de cada muestra fue recuperado y eluido en columnas cromatográficas Poly-Prep Bio-rad las cuales contenían 1 ml de resina DOWEX, se

dejó eluir el sobrenadante sin colectarlo, posteriormente se adicionaron 3 ml de H₂O a cada columna y se colectaron las muestras, estas muestras contienen el [³H]ATP. Para colectar el AMPc se colocaron las columnas con resina DOWEX sobre columnas de alúmina, se agregaron 5mL de H₂O sobre las columnas DOWEX y se dejó eluir el material sin colectarlo, una vez eluido este volumen se retiraron las columnas DOWEX y se agregaron 4mL de solución Tris-HCl [50mM], el material se colectó para recuperar el AMPc.

Una vez colectadas las diferentes muestras se agregó líquido de sentelleo para posteriormente cuantificar la marca radiactiva por sentellometria líquida. La cantidad de AMPc se expresa en porcentajes y se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\%[3H]AMPc = \frac{[3H]AMPc}{[3H]ATP + [3H]AMPC} \times 100$$

Ensayos de acumulación de fosfoinosítidos:

Para la realización de los experimentos de fosfoinosítidos se utilizaron sinaptosomas de globo pálido externo, los sinaptosomas fueron incubados durante 45 minutos en Krebs Henseleit [NaCl 130mM, KCl 5mM, MgSO₄ 1.2mM, CaCl 1.2 mM, Hepes 20mM, Na₂HPO₄ 1.2mM, glucosa 10mM] y [³H]mioinositol (2μCi/mL) [0.3μM]. transcurrido el tiempo de incubación con la marca los sinaptosomas se centrifugaron a 11000g durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron los sinaptosomas con solución Krebs Henseleit más LiCl [10mM] para inhibir la degradación de los fosfoinosítidos.

Cada condición se incubó en un volumen total de 300μL donde se incluyeron los diferentes tratamientos, la incubación con los fármacos se realizó por 30 minutos en baño maría a 37°C con agitación constante, la reacción enzimática se detuvo agregando 600μL de solución de paro (HCL-MeOH 1:1.44 v/v). una vez detenida la reacción las muestras se congelaron a -4°C durante 30 minutos, después del proceso de congelación las muestras se centrifugaron a 11000g durante 10 minutos para eluir

el sobrenadante. Para la separación cromatográfica se utilizaron columnas cromatográficas Poly-Prep Bio-rad las cuales fueron llenadas con 1mL de resina AG 1-X8. La separación se inició eluyendo el sobrenadante en las columnas cromatográficas, esta porción no fue colectada, posteriormente se agregaron 10mL de H₂O a cada columna sin colectar esa fracción.

Posteriormente se agregó a la columna 10mL de una solución 60mM de formato de amonio/5μM de tetraborato de sodio y tampoco se colectó, finalmente para recuperar los monofosfatos se agregó a cada columna 8mL de una solución con 200mM formato de amonio/100mM ácido fórmico y se colectó en viales de sentelleo a los cuales se les agregó líquido de sentelleo para su posterior cuantificación por sentellometría líquida. La cantidad de monofosfatos se expresa en porcentajes comparados contra la condición control a partir de la siguiente fórmula:

$$\%monofosfatos = \frac{Monofosfatos\ Basal}{Monofosfatos\ Tratamiento} \times 100$$

Experimentos de coimmunoprecipitación y westernblot:

Para los experimentos de inmunoprecipitación se utilizaron sinaptosomas obtenidos a partir de rebanadas de globo pálido, los sinaptosomas fueron solubilizados en solución RIPA [Tris-HCl 40mM, NaCl 150mM, EDTA 2mM, Glicerol 10%, Deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.2%] pH 7.6, además se agregaron inhibidores de proteasas en este caso complete (20μL/mL de RIPA) y PMSF [100mM] (5mL/mL de RIPA). Una vez resuspendidos los sinaptosomas en esta solución se dejaron en baño de hielo durante por lo menos 20 minutos, transcurrido este tiempo los sinaptosomas fueron sonicados para mejorar la separación de las proteínas.

A cada muestra para la coimmunoprecipitación se le agregaron 500μg de proteína sinaptosomal la cual fue cuantificada con anticipación con el método espectrofotométrico de Bradford. Las muestras fueron aforadas a 500mL con RIPA y

se les agregaron los anticuerpos primarios a una concentración 1:2000 en los dos casos, es decir para en las dos condiciones experimentales, tanto para el receptor A_{2A} y para el receptor D₂. Las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4°C durante 8 horas en agitación constante. Transcurrido el tiempo de incubación con los anticuerpos primarios las muestras fueron adicionadas con 20µl de perlas A/G para lograr la inmunoprecipitación del complejo antígeno anticuerpo, el periodo de incubación duró 12 horas a 4°C y con agitación constante.

Transcurrido el tiempo de incubación de las muestras, se procedió a centrifugarlas a 20000g durante 5 minutos retirando posteriormente el sobrenadante y resuspendiendo el complejo con RIPA, este proceso de lavado se repitió por 5 ocasiones para eliminar las proteínas inespecíficas, una vez lavadas las muestras se centrifugaron por última vez y se les agregaron 20µL de buffer muestra [Tris-Base 0.3125M, SDS 10%, glicerol 50%, β-mercaptoetanol 25%, azul de bromofenol 0.5%, pH 6.8%], todas las muestras fueron hervidas durante 10 minutos y refrigeradas hasta el momento en que se utilizaron para correrlas en un gel de electroforesis.

Para el procedimiento de electroforesis se recuperaron los 20µL del buffer con las muestras y se hicieron correr en un gel al 10% a una intensidad de 85-100mA en un buffer de corrida [Tris-Base 0.025M, glicina 0.192M, SDS 0.1%] pH8.3, concluida la electroforesis las proteínas contenidas en el gel fueron transferidas a una membrana de PVDF, la cual se hidrató y activó previamente con metanol y se lavo con H₂O. La transferencia se realizó durante 8 horas en cámara húmeda con un buffer de transferencia [Tris-Base 0.05M, glicina 0.38M, metanol 20%, pH 8.3] a una intensidad de 85mA. Una vez concluida la transferencia a la membrana, esta se incubó se bloqueó durante 12 horas con una solución de leche al 7% y TBS-Tween al 0.1%, después del bloqueo con leche la membrana fue lavada 3 veces en agitación constante en periodos de 5, 10 y 15 minutos en solución TBS- Tween 0.01% [Tris-Base 1M, NaCl 2M, Tween 20 0.1%, agua MilliQ].

Después del periodo de bloqueo y lavado las membranas estas se incubaron con el anticuerpo primario para el receptor A_{2A} ó D₂ según fuera el caso, los anticuerpos se utilizaron a una concentración 1:2000 y se dejaron por doce horas en

refrigeración a 4°C, al finalizar el tiempo de incubación las membranas fueron lavadas con tres veces con TBS-Tween en agitación constante durante 5, 10 y 15 minutos. Después de los lavados las membranas fueron incubadas con los anticuerpos (anti-rabbit) secundarios en concentración 1:5000 y se dejaron en refrigeración por espacio de 6 horas. Para finalizar con el proceso de preparación de la membrana, esta se lavó 3 veces con solución TBS-Tween en agitación constante. Para el revelado mediante el método Kodak las membranas fueron teñidas con el agente luminicente ECL-plus y se realizaron las placas para su posterior evaluación.

Análisis estadístico:

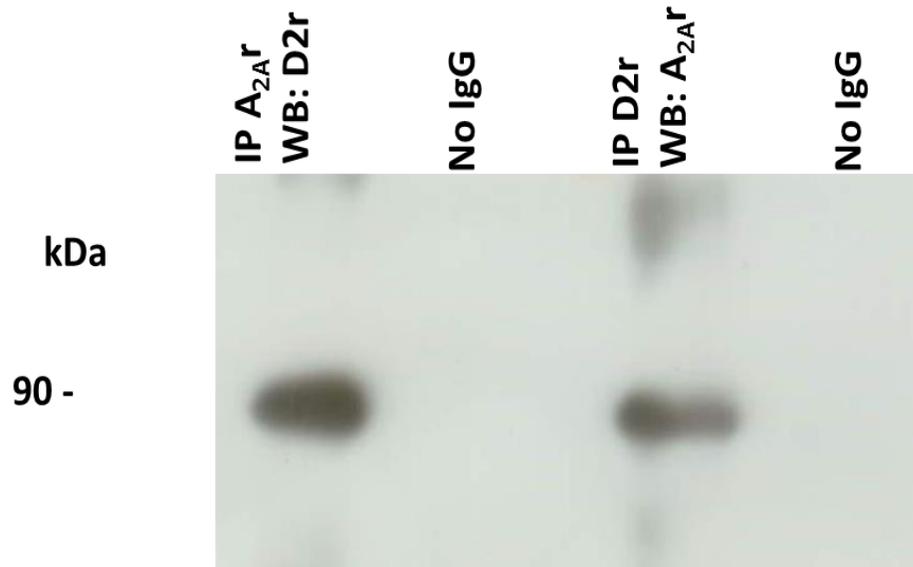
Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software de laboratorios Prism, Grhapad 5.0, además de la hoja de cálculo Lotus 123 y Excel 2010. Para los experimentos de liberación de [³H]GABA, acumulación de AMPc y formación de fosfoinosítidos se determinaron las áreas bajo la curva utilizando el método de aproximación de trapecios, es importante resaltar que de cada condición experimental se realizaron por lo menos 4 repeticiones y que cada experimento tuvo como mínimo una n=3, de las áreas bajo la curva calculadas se hizo un análisis de varianza de una vía con un análisis post-hoc de comparación múltiple de Tukey.

Resultados

1. Los receptores A_{2A} y D2 coinmunoprecipitan en terminales nerviosas de globo pálido de rata.

Como ya analizamos en la revisión de bibliografía existe evidencia suficiente de la interacción a nivel proteína-proteína entre los receptores A_{2A} y D2, esta evidencia como ya apuntamos se encuentra sustentada en experimentos en sistemas de expresión heteróloga. Con la idea de ahondar en la posibilidad de una entidad dimérica realizamos experimentos de coinmunoprecipitación en las terminales nerviosas del globo pálido obtenidas por centrifugación diferencial, en el entendido de que si existe dicha interacción proteína-proteína en un procedimiento de este tipo las proteínas deben coprecipitar. Los resultados se muestran en la figura 11, se puede observar la inmunoprecipitación del receptor A_{2A} y el revelado con la técnica de Kodak del receptor D2 por medio de westernblot, se observa una banda de un peso aproximado a los 90 kDa, así mismo al hacer la maniobra experimental inversa inmunoprecipitando al receptor de dopamina D2 y revelando contra el receptor de adenosina A_{2A} se observa también la aparición de una banda justamente a nivel de los 90kDa, en la misma imagen se observa también en cada caso se incluyeron muestras blanco para descartar un falso positivo de la interacción.

Figura 11



Los receptores A_{2A} y D2 coimmunoprecipitan en sinaptosomas de globo pálido. De izquierda a derecha inmunoprecipitación del receptor A_{2A} y westernblot de los receptores D2, westernblot del receptor D2 sin anticuerpo primario para el receptor A_{2A}, inmunoprecipitación del receptor D2 y westernblot del receptor A_{2A} y Westernblot del receptor A_{2A} sin anticuerpo primario en la inmunoprecipitación del receptor D2.

2. La coactivación de receptores A_{2A} y D2 estimula la liberación de GABA en rebanadas de globo pálido.

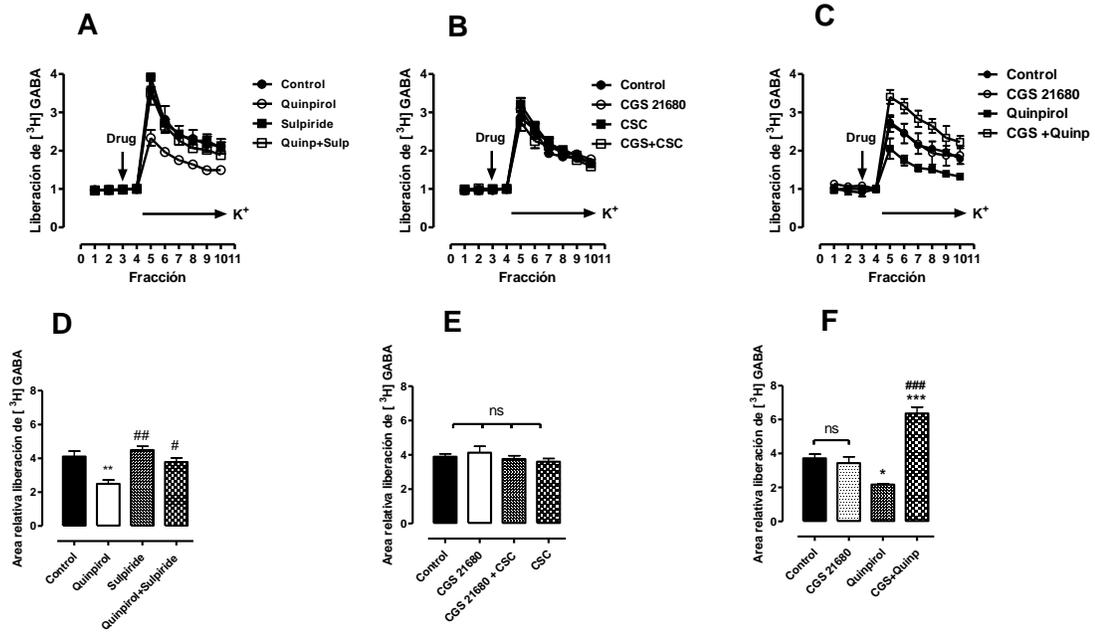
Con la finalidad de caracterizar el resultado de la activación de ambos receptores se realizaron las siguientes maniobras experimentales, por un lado se activó al receptor D2, en otro experimento se activó únicamente a los receptores A_{2A} y finalmente se coactivaron a los receptores A_{2A} y D2. Se usaron los antagonistas selectivos para ver si el efecto estaba mediado por receptor. Es importante hacer énfasis que los experimentos de liberación de GABA que mostramos se realizaron en ratas reserpinizadas con la finalidad de poder observar de manera más clara los efectos de los receptores activados por separado y coactivados.

En el panel A y D de la figura 12 mostramos que la activación de los receptores D2 con su agonista quinpirol [10µM] producen una disminución en la liberación del neurotransmisor comparado con el control (área relativa control 4.11±0.31 vs quinpirol 2.49±0.22 p<0.01), así también en esta gráfica se observa que el sulpiride [10µM] un antagonista de los receptores D2 por sí solo no modifica la liberación de GABA cuando se compara con el control (área relativa control 4.11±0.31 vs sulpiride 4.49±0.21 n.s.) y como era de esperar al incluir en la preparación el agonista del receptor más el antagonista el efecto inhibitorio sobre la liberación se ve completamente prevenido al llevar los niveles de neurotransmisor iguales a los del grupo control (área relativa control 4.11±0.31 vs quinpirol+ sulpiride 3.78±0.25 p<0.01). Continuando en esta gráfica se puede observar en el panel B y E que la activación del receptor A_{2A} con su agonista selectivo el CGS21680 [1µM] no modifican la liberación de GABA cuando se compara con el grupo control (área relativa control 3.89±0.17 vs CGS 21380 4.13±0.36 n.s.), además de observarse que el antagonista para el receptor A_{2A}, el CSC [1µM] tampoco produce modificación en la liberación cuando se compran con el control (área relativa control 3.89±0.17 vs CSC 3.60±0.18 n.s.).

Finalmente en el panel C y D de la figura 12 mostramos el resultado de la coactivación de los receptores A_{2A} y D2 en la terminal estriado-palidal, en ella

podemos apreciar que tras la coactivación de los receptores se da un aumento significativo en la liberación de GABA cuando se compara esta condición con la condición control (área relativa control 3.73 ± 0.24 vs CGS 21680+quinpirol 6.36 ± 0.38 $p < 0.001$), la condición en la que se activa únicamente al receptor D2 (área relativa control 3.73 ± 0.24 vs quinpirol 2.17 ± 0.03 , $p < 0.05$) y también cuando se activa sólo a los receptores A_{2A} (área relativa control 3.73 ± 0.24 vs CGS 21380 3.44 ± 0.36 n.s.).

Figura 12



La coactivación de receptores A_{2A} y D2 estimula la liberación de GABA en la rata reserpinizada.

A y D. La activación del receptor D2 (Quinpirol [$10 \mu\text{M}$]) inhibe la liberación de GABA estimulada por K^+ , quinpirol [$1 \mu\text{M}$], el bloqueo del receptor D2 (sulpiride [$10 \mu\text{M}$]) no modifica la liberación de GABA. **B y E.** La activación del receptor A_{2A} (CGS21680 [$1 \mu\text{M}$]) no modifica la liberación estimulada por K^+ . **D y F.** la coactivación de los receptores $A_{2A}/D2$ estimula la liberación de GABA. * $P < 0.05$ contra control, *** $P < 0.001$ contra control y ### $P < 0.001$ contra CGS21680.

3. La coactivación de receptores $A_{2A}/D2$ estimula la liberación a través de la vía $G_{i/o}\beta\gamma\rightarrow PLC-IP3/DAG\rightarrow PKC$ y no Adenilato ciclasa $\rightarrow AMPc\rightarrow PKA$.

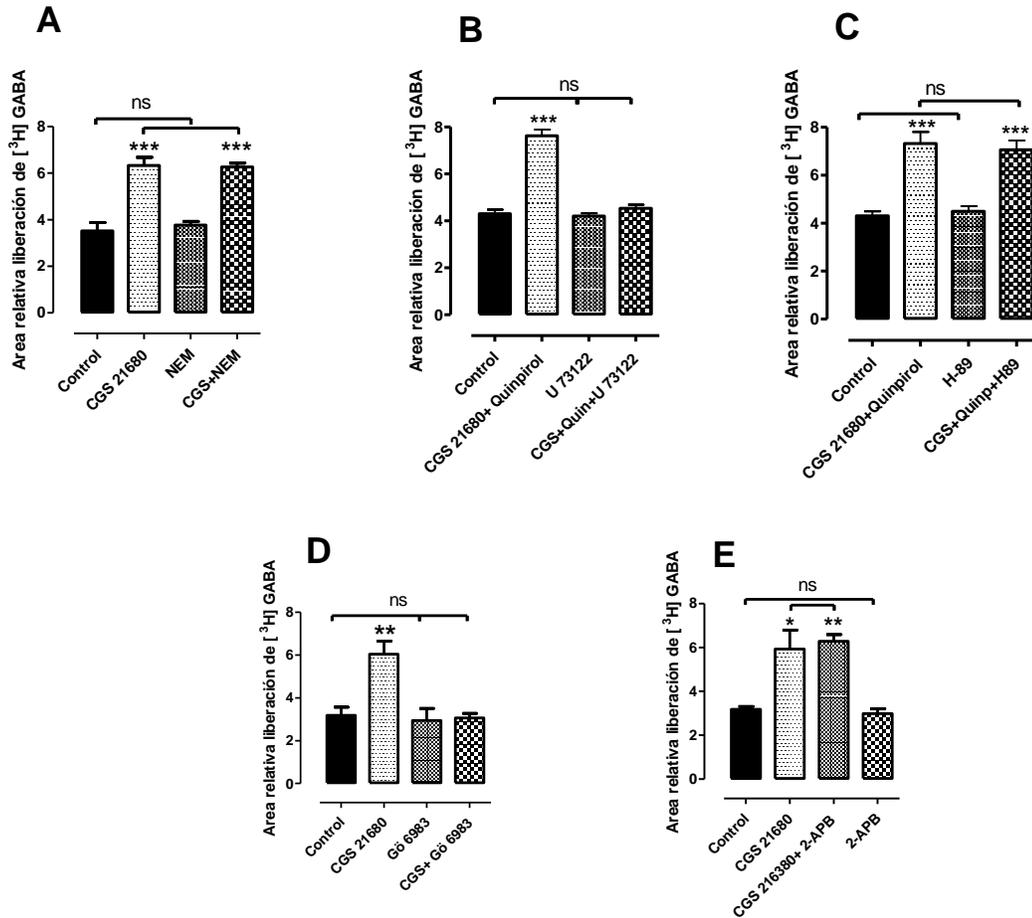
Para tratar de dilucidar la vía de transducción de señales de los receptores A_{2A} y $D2$ al ser coactivados en los experimentos de liberación de GABA, realizamos maniobras de bloqueo farmacológico de las proteínas $G_{i/o}$ con N-etilmaleimida [$10\mu M$] esto para descartar o en su caso confirmar la activación de la vía $G_{i/o}/\beta\gamma\rightarrow PLC-IP3/DAG\rightarrow PKC$ ó Adenilato ciclasa $\rightarrow AMPc\rightarrow PKA$. En el panel A de la figura 13 panel se muestra la maniobra experimental en la que al utilizar N-etilmaleimida un bloqueador de las proteínas $G_{i/o}$, el efecto estimulador de la liberación de GABA modulado por la coactivación de los receptores no se previene descartando la participación de una proteína $G_{i/o}$ en el mecanismo de liberación originado por la actividad de ambos receptores (área relativa control 3.52 ± 0.35 vs CGS 21380+quinpirol 6.33 ± 0.3 , $p<0.001$, área relativa CGS+quinpirol+NEM 6.26 ± 0.17 , n.s. con respecto CGS+quinpirol solo) en tanto que el NEM no modificó la liberación por sí mismo (área relativa control 3.52 ± 0.35 vs NEM 3.76 ± 0.16 , $p<0.001$).

Para poder explorar la posibilidad de la participación de la fosfolipasa C en la vía de transducción de señales de estos dos receptores utilizamos el bloqueador de la PLC el U73122 [$10\mu M$], como se aprecia en el panel B de la figura 13 por una parte el bloqueador de la PLC no tiene ningún efecto ni modifica la liberación de las rebanadas de globo pálido (área relativa control 4.30 ± 0.17 vs U 73122 4.20 ± 0.15 , n.s.), sin embargo al analizar el efecto que tiene el bloqueo de la PLC en la condición en la que se coactivan a los dos receptores encontramos que el efecto estimulador sobre la liberación de GABA es completamente prevenido llevando los valores a niveles de la condición control (área relativa control 3.52 ± 0.35 vs CGS 21380+quinpirol 7.62 ± 0.26 vs CGS+quinpirol+U 73122 4.53 ± 12 , n.s. con respecto del control).

Para descartar la participación de la PKA en la vía de señalización tras la coactivación nos valimos del bloqueador de la PKA el H89 [$10\mu M$] podemos observar el panel C de la gráfica que el H89 no es capaz de modificar la liberación cuando se compran con la condición control (área relativa control 4.30 ± 0.19 vs H89 4.49 ± 0.21 , n.s.), y de manera muy interesante el bloqueo de la PKA no fue capaz de modificar el efecto estimulador sobre la liberación de GABA cuando se coactivan a los dos receptores (área relativa CGS21380+quinpirol 7.32 ± 0.48 vs CGS 21380+quinpirol+H89 7.06 ± 0.38 , n.s.).

Dado que el bloqueo de la PLC previene la estimulación de la liberación evocada por la coactivación continuamos con la disección farmacológica de la ruta de señalización evaluando la participación de la PKC y el receptor de IP3. En el panel D de la figura que el bloqueador de la PKC, el Gö6983 [10 μ M], por una parte no es capaz de modificar la liberación en las terminales cuando se compara con el grupo control (área relativa control 3.19 ± 0.38 vs Gö6983 2.94 ± 0.56 , n.s.), un hallazgo que resulta por demás interesante es que al coactivar ambos receptores en la preparación e incluir el bloqueador de la PKC el efecto estimulador sobre la liberación de GABA se ve prevenido (CGS+quinpirol 6.07 ± 0.61 vs CGS+quinpirol+Gö6983 3.18 ± 0.38 , $p < 0.001$). Finalmente para descartar la participación de el calcio proveniente de los compartimientos intracitoplásmicos al estimular la formación de IP3, utilizamos un bloqueador del receptor de IP3, el 2-APB [10 μ M], como se puede apreciar en el panel E de la figura encontramos que el fármaco no fue capaz de modificar la liberación de neurotransmisor cuando se compara con la condición control (área relativa control 3.18 ± 0.15 vs 2-APB 2.98 ± 0.22 , n.s.) y tampoco modificó la liberación de GABA en la condición en la que se coactivaron a los receptores A_{2A} y D2 (CGS+quinpirol 4.93 ± 0.86 vs CGS+quinpirol+4-APB 6.28 ± 0.30 , n.s.).

Figura 13



La coactivación de receptores A_{2A}/D_2 estimula la liberación de GABA a través de la vía $G_{i/o}\beta\gamma \rightarrow PLC-IP_3/DAG \rightarrow PKC$ y no Adenilato ciclasa $\rightarrow AMPc \rightarrow PKA$. **A.** El bloqueo de las proteínas $G_{i/o}$ (NEM [10 μ M]) no modifica la liberación de GABA comparada con el control. **B.** El bloqueo de la PLC (U73122 [10 μ M]) previene el efecto estimulador de la coactivación de los receptores A_{2A}/D_2 . **C.** El bloqueo de la PKA (H89 [10 μ M]) no modifica la liberación estimulada por la coactivación del dímero. **D.** El bloqueo de la PKC (Gö6983 [10 μ M]) previene el efecto estimulador sobre la liberación de GABA. **E.** El bloqueo del receptor a IP_3 (Gö6983 [10 μ M]) no modifica la liberación estimulada por la coactivación de los receptores A_{2A}/D_2 . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $P < 0.01$ contra control.

4. La formación de segundos mensajeros confirma la vía de señalización mostrada en la liberación de GABA y destaca el papel de la CaMKII

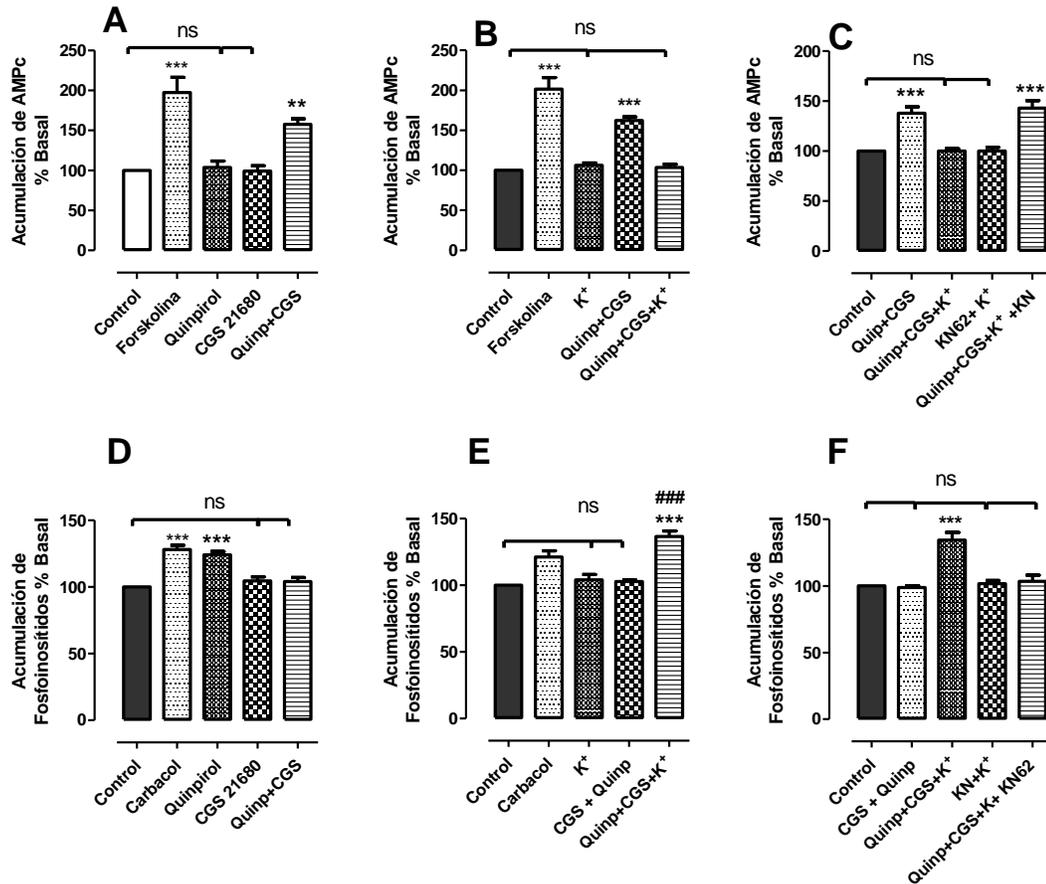
Dado que la liberación de GABA estimulada por la coactivación de los receptores indicaba la posibilidad de activarse la vía $G_{i/o}\beta\gamma \rightarrow \text{PLC-IP}_3/\text{DAG} \rightarrow \text{PKC}$ decidimos estudiar si correspondía con la formación de fosfoinosítidos y/o en su caso acumulación de AMPc, también analizamos la participación de calcio y la participación de la CaMKII tras coactivar al heterodímero. En el panel A de la figura 14 observamos que la forskolina [10 μ M] genera un aumento de formación de AMPc comparado contra la condición control (área relativa control 100% vs forskolina 197% \pm 19 $p < 0.01$), un control que nos indica la viabilidad de la preparación y la actividad de la adenilato ciclasa, por otra parte observamos que tras activar a los receptores D2 con quinpirol [10 μ M] no se modifica la cantidad de AMPc producido cuando se compara contra la condición control (área relativa control 100% vs Quinpirol 103% \pm 7 n.s.), lo mismo ocurre cuando se estimula al receptor A_{2A} en la preparación, no se modifican los niveles de AMPc (área relativa control 100% vs CGS21680 99% \pm 6 n.s.). Muy interesante resulta el hecho de que en el mismo experimento al coactivar al dímero $A_{2A}/D2$ la cantidad de AMPc se incrementa de manera significativa cuando se compara con las condiciones control o de la activación de los receptores por separado (área relativa control 100% vs Quinpirol+CGS 157% \pm 7 $p < 0.01$).

Para confirmar que lo observado en los experimentos de liberación de GABA ocurre también en los experimentos de acumulación de AMPc se sometió a los sinaptosomas a condiciones despolarizantes, en el panel B de la figura 14 observamos que al incluir potasio en la preparación el efecto estimulador sobre la formación del AMPc después de la coactivación de receptores se ve prevenido por completo (área relativa Quinpirol+CGS 162.3% \pm 4.667 vs Quinpirol+CGS+K+ 104% \pm 3.844 $p < 0.001$) mientras que la despolarización por sí misma no modifica la formación de AMPc. Dado que la despolarización activa a la CaMKII y este es también objeto de nuestro estudio, decidimos bloquear la cinasa con el bloqueador selectivo KN62 durante la despolarización y ver si esto modifica la respuesta de la coactivación, de manera interesante en el panel C se aprecia que al bloquear a la CaMKII en condiciones despolarizantes de nueva cuenta se genera aumento en la formación de AMPc tras coactivar a ambos receptores (área relativa Quinpirol+CGS+K 100% \pm 2.449 vs Quinpirol+CGS+K+KN 143% \pm 7.561).

Para valorar la participación de los fosfoinosítidos como parte de la vía de señalización del dímero, fueron determinados en las mismas condiciones en las que se midió

la formación de AMPc en estos experimentos observamos en el panel D que en los sinaptosomas de globo pálido tras activar a los receptores muscarínicos con carbacol a una concentración 50mM las concentraciones de fosfoinosítidos se incrementan cuando se comparan con la condición control (área relativa control 100% vs Carbacol 128% \pm 3 $p < 0.001$), un resultado que nos valida la técnica y la viabilidad de las terminales para continuar con el experimento, en esta misma gráfica podemos ver que la activación del receptor D2 con quinpirol [10 μ M] produce también un incremento en la formación de fosfoinosítidos cuando se contrasta con el control (área relativa control 100% vs Quinpirol 24 \pm 2 $p < 0.001$), así también se observa que tras la activación del receptor A_{2A} no se presenta ningún cambio en la cantidad de fosfoinosítidos producidos si se compara contra la situación control (área relativa control 100% vs CGS 104% \pm 3 n.s.) y finalmente tras coactivar al dímero en la misma condición tampoco es posible apreciar un incremento o modificación de los niveles de fosfoinosítidos en la condición (área relativa control 100% vs Quinpirol+CGS 104% \pm 3 n.s.). Los efectos de la despolarización se muestran en el panel E en donde al someter a la terminal a condiciones despolarizantes con potasio [15mM] es posible encontrar el incremento de los fosfoinosítidos al coactivar los receptores cuando se compara con la condición control (área relativa control 100% vs Quinpirol+CGS+K 136% \pm 4 $p < 0.001$), un efecto que se previene cuando a la misma preparación se le incluye el tratamiento con el bloqueador de la CaMKII, el KN69 (área relativa control 100% vs Quinpirol+CGS+K+KN 103% \pm 4 n.s.), como se aprecia en el panel F.

Figura 14



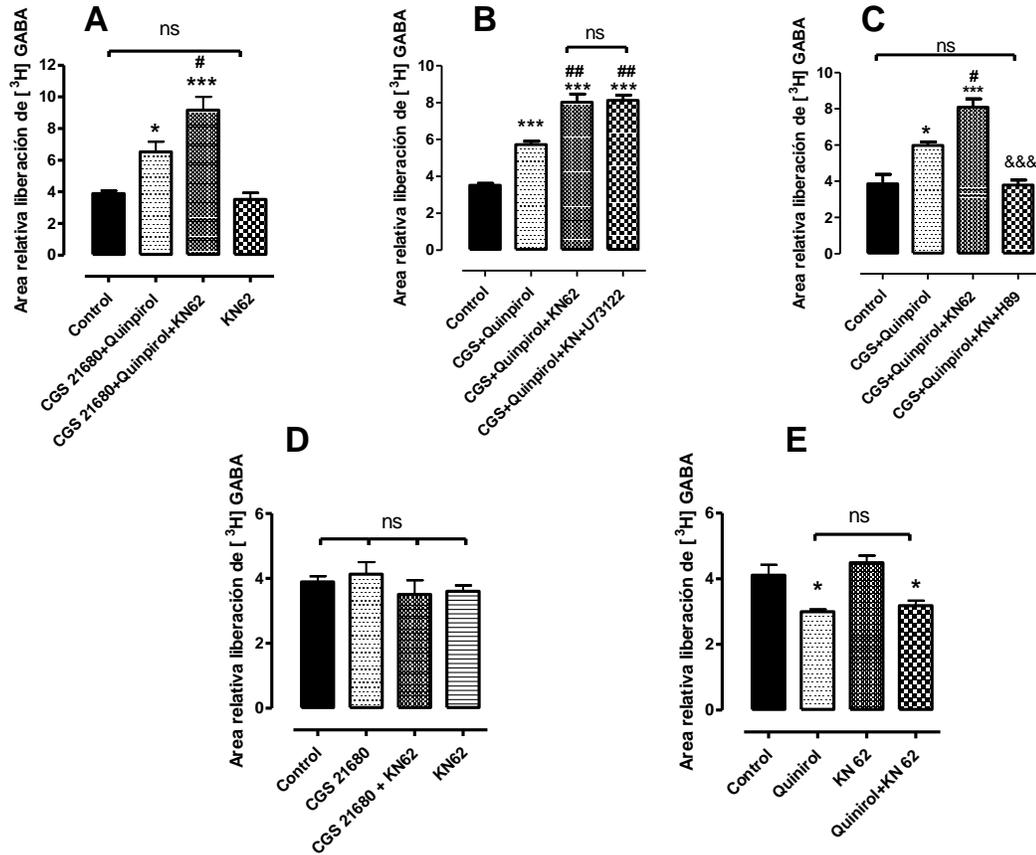
La formación de segundos mensajeros confirma la vía de señalización mostrada en los experimentos de liberación de GABA y destaca el papel de la CaMKII. **A.** La activación de la adenilato ciclásas con Forskolina [10 μ M] aumenta la formación de AMPc, la coactivación del receptor A_{2A} (CGS2160[1 μ M]) y D2 (Quinpirol [10 μ M]) incrementan la formación de AMPc. **B.** El efecto estimulador sobre la formación de AMPc al coactivar a los receptores A_{2A} y D2 se previene con KCl [15nM]. **C.** El bloqueo de la CaMKII con KN62 [4 μ M] previene el efecto de la despolarización. **D.** La activación de los receptores D2 incrementa la acumulación de fosfoinosítidos. **E.** en condiciones despolarizantes la coactivación del dímero incrementa la acumulación de fosfoinosítidos. **F.** El bloqueo de la CaMKII en condiciones despolarizantes previene el efecto estimulador sobre la acumulación de fosfoinosítidos ** p< 0.01 contra control y *** p< 0.001 contra el control.

5. La CaMKII determina la vía de señalización del dímero A_{2A}/D2.

Dado que la despolarización y la activación de la CaMKII modifican la formación de segundos mensajeros durante la activación del dímero, para continuar con el análisis de la participación de la CaMKII en la vía de señalización del dímero A_{2A}/D2 en experimentos de liberación de GABA radiactivo en rebanadas de globo pálido observamos en la figura 15 la gráfica del panel A, en donde apreciamos que el bloqueo de la CaMKII con KN62 es capaz de potenciar los efectos de la liberación de GABA estimulados por la coactivación de ambos receptores (área relativa CGS+Quinpirol 6.53±0.6 vs CGS+Quinpirol+KN 9.17 ± 0.8 p<0.001). Por otra parte, condiciones en las que la CaMKII no se encuentra bloqueada, en el panel B y C podemos apreciar que el efecto estimulador sobre la liberación de GABA tras coactivar al dímero no se modifica cuando se bloquea en las mismas condiciones a la PLC con el fármaco U73122 [10µM] y a la CaMKII con el KN62 (área relativa CGS+quinpirol+KN 8.02±0.4 vs CGS+quinpirol+KN+U73122 8.12 ±0.3 p<0.001) un resultado que sorprende y que nos lleva a la siguiente estrategia experimental, bloquear de nueva cuenta a la CaMKII y a la PKA para explorar una posible modificación en la vía de señalización del dímero, en el panel C observamos que en efecto tras realizar esta maniobra experimental, el efecto estimulador sobre la liberación de GABA modulada por la coactivación del dímero se ve prevenido por completo cuando se bloquea también a la CaMKII y a la PKA (área relativa CGS+quinpirol+KN 3.85 ±0.5 vs CGS+quinpirol+KN+H89 3.79 ±0.27 p<0.001).

Finalmente como parte de este proceso de intentar entender el papel de la CaMKII en la modulación de los receptores decidimos explorar la posibilidad de una modulación de los receptores por separado dependiente de la CaMKII, y podemos apreciar en la gráfica del panel D que la activación del receptor A_{2A} aun en estas condiciones no modifica la liberación de GABA (área relativa control 3.89 ±0.17 vs CGS+Quinpirol+KN62 3.51±0.18 n.s.). En lo que respecta al receptor D2 observamos que este al ser activado genera una disminución de GABA liberado cuando se compara con la condición control, de nueva cuenta al incluir en la preparación el agonista para el receptor D2 y el bloqueador de la CaMKII no se observa una modificación en inhibición de la liberación de GABA producida por la activación del receptores (área relativa Quinpirol 2.99±0.07 vs Quinpirol+KN62 3.17 ±0.15 n.s.).

Figura 15



La CaMKII determina la vía de señalización del dímero A_{2A}/D₂: **A.** El bloqueo de la CaMKII con KN62 [4μM] potencializa en efecto estimulador de liberación de GABA tras la coactivación del dímero. **B.** Cuando la CaMKII se encuentra bloqueada no se activa la vía de la PLC. **C.** El bloqueo de la CaMKII cambia la vía de señalización del dímero a través de la PKA. **D** y **E.** El bloqueo de la CaMKII no modifica la actividad de los receptores cuando se activan por separado. * p < 0.05 contra control, *** p < 0.001 contra control, # p < 0.05 contra CGS21680+Quinpirol, ## p < 0.01 contra CGS21680+Quinpirol y &&& p < 0.001 contra GCS+Quinpirol+KN62.

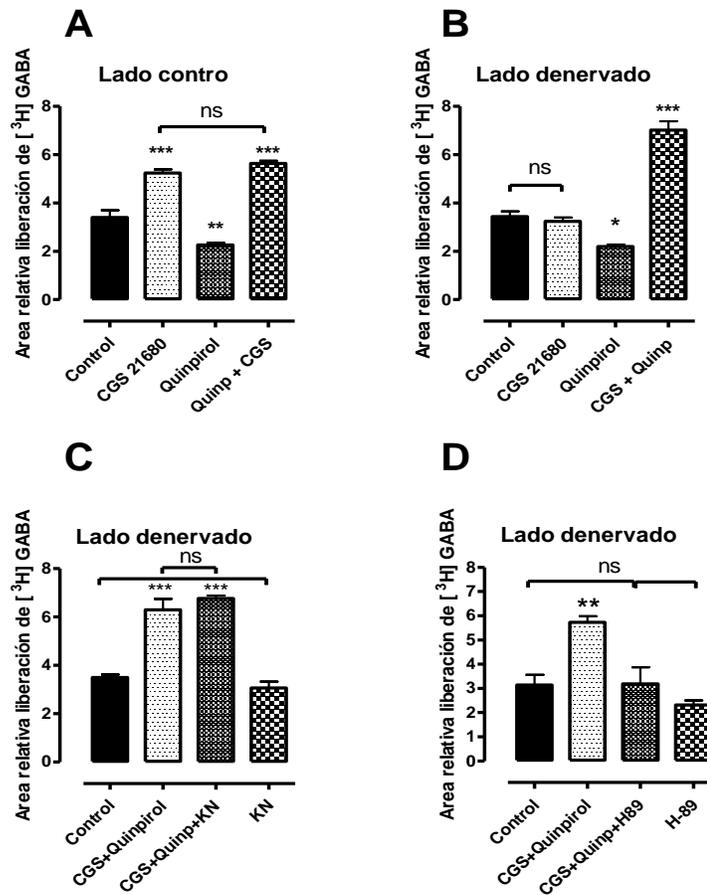
6. En la denervación dopaminérgica el dímero A_{2A}/D2 estimula solo la vía Adenilatociclasa→AMPc→PKA y la CaMKII no regula su actividad.

Otro punto que decidimos valorar es la vía de señalización del dímero en condiciones de Parkinson experimental y el papel de la CaMKII en esta condición dada la propuesta del uso de los antagonistas de los receptores A_{2A} en la enfermedad de Parkinson. Para este propósito utilizamos rebabanadas de globo pálido de ratas lesionadas con 6-OHDA, en el panel A de la figura 16 observamos una maniobra en donde se activa al receptor A_{2A} con su agonista selectivo, el CGS21680 [1µM] se entiende que esta condición el receptor D2 se encuentra activado por la dopamina endógena, el resultado de esta coactivación es un incremento de la liberación de GABA cuando se compara con la situación control (área relativa control 3.40 ±0.30 vs CGS21680 5.24±0.15 p<0.001). De manera muy interesante, cuando en la misma preparación coactivamos al receptor A_{2A} y al receptor D2 con quinpirol, encontramos que la cantidad de GABA liberado no es diferente a la cantidad de GABA liberado cuando se activa únicamente al receptor A_{2A} (área relativa CGS 5.243 ±0.15 vs Quinpirol+CGS 5.850 ±0.1167 n.s.). Un dato que resulta revelador es el observado en el panel B en donde en la rebanada de globo pálido de la rata lesionada no responde con un aumento en la cantidad de GABA liberado cuando se estimula únicamente al receptor A_{2A} quedando patente la necesidad de que se encuentre coactivado el receptor D2 para que se puedan apreciar los efectos estimulatorios sobre la liberación de GABA (área relativa control 3.430 ±0.22 vs CGS 3.243 ±0.15 n.s.), además otro resultado que es aún más interesante es la cantidad de neurotransmisor que se libera en la condición de denervación cuando se coactiva al dímero observándose una mayor cantidad de GABA liberado cuando se compara contra el lado control (Quinpirol+CGS normal 5.633 ±0.11 vs Quinpirol+CGS denervado 7.017 ±0.36). En esta misma figura en el panel C evidenciamos la pérdida en la modulación del dímero a través de la CaMKII, pues como se observa al coactivar al dímero y en la misma condición incluir al KN62 no se modifica la cantidad de GABA liberado cuando se compara con la condición en la que la CaMKII no se encuentra bloqueada (CGS+Quinpirol 6.3 ±0.45 vs CGS+Quinpirol+KN 6.7 ±0.12 n.s.).

Como paso final en este apartado y para conocer la vía de señalización del dímero funcional en condiciones de denervación dopaminérgica en el experimento de liberación de

GABA radiactivo que encontramos en el panel D de la figura 16, el bloqueo de la PKA con el H89 previene el efecto estimulador sobre la liberación, dejando los valores en igualdad a la condición control (área relativa control 3.14 ± 0.42 vs CGS+Quinpirol+H89 3.19 ± 0.69 n.s.).

Figura 16



En la denervación dopaminérgica el dímero A_{2A}/D₂ estimula solo la vía Adenilato ciclasa→AMPC→PKA y la CaMKII no regula su actividad. **A.** En el lado control la activación del receptor A_{2A} estimula la liberación de GABA y la activación del receptor D₂ la inhibe. **B.** En el lado denervado la activación del receptor A_{2A} no aumenta la liberación de GABA, el receptor D₂ disminuye la liberación y la coactivación de los receptores A_{2A}/D₂ incrementan la liberación de GABA. **C.** En la denervación el bloqueo de la CaMKII no modifica la liberación de GABA cuando se coactiva al dímero. **D.** En el lado denervado el dímero señala vía PKA. *p<0.05, **p< 0,01 y ***p<0.001 contra control.

7. El efector final de la señalización del dímero A_{2A}/D2 es el canal de calcio tipo L.

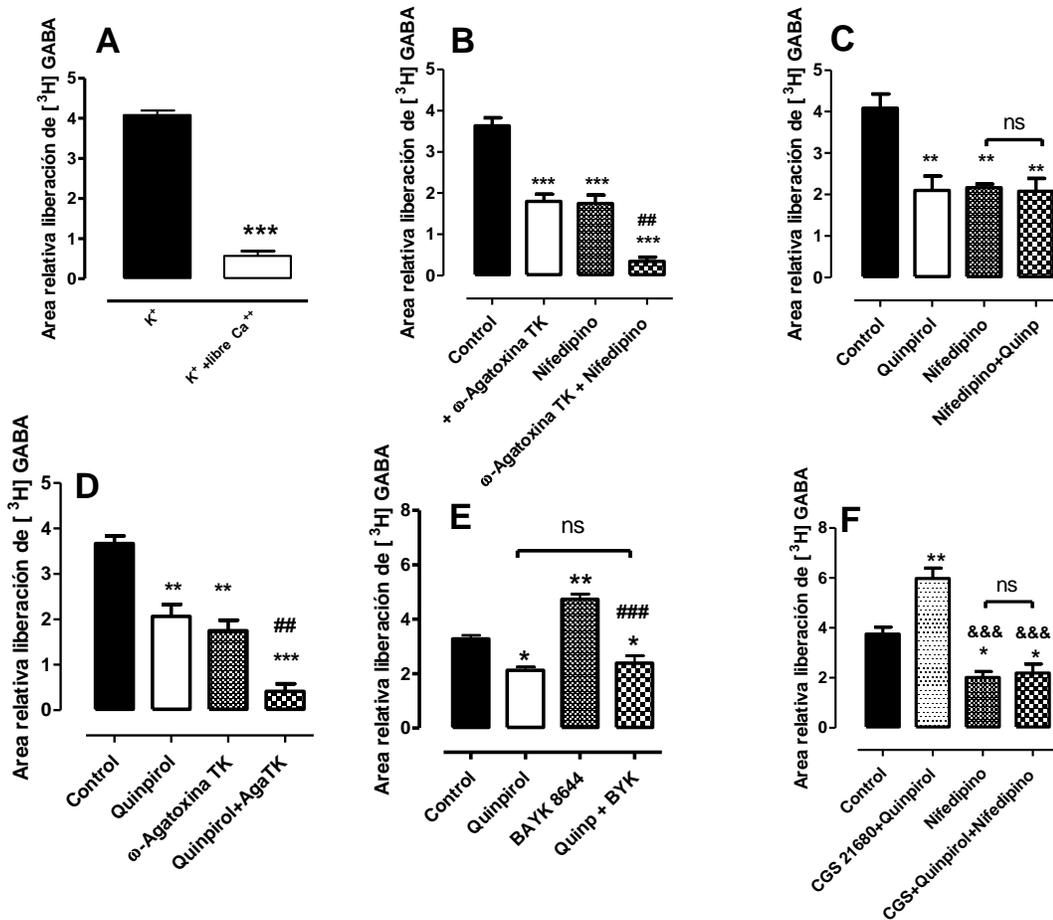
Por último estudiamos el efector final en la cascada de señalización que acontece a la coactivación del receptor A_{2A} y D2, , mediante el bloqueo de los canales de calcio de tipo P/Q y L con bloqueadores selectivos. En el panel A de la figura 17 mostramos un experimento en donde la solución se encuentra sin calcio, como se puede ver la disminución en la liberación resulta significativa cuando se compara con la condición control (área relativa control 4.08 ±0.11 vs 0.57 ±0.11 p<0.001). En el panel B podemos apreciar que la despolarización inducida por potasio es dependiente de los canales de calcio tipo P/Q, pues al bloquearlos con ω-agatoxina TK [0.95μM] la cantidad de GABA liberado en la terminal disminuye (área relativa control 3.63 ±0.18 vs 1.79 ±0.17 p<0.001), además en esta misma gráfica observamos también que el canal de calcio tipo L modula una parte de la liberación de GABA en la terminal ya que al bloquear a este canal con nifedipino [10 μM] también se aprecia una disminución del GABA liberado cuando se compara con la condición control (área relativa control 3.63 ±0.18 vs 1.74±0.20 p<0.001), como complemento de estos hallazgos tenemos también un efecto sumado cuando incluimos en la preparación el bloqueador de los canales P/Q y el de los canales de tipo L de manera concomitante (área relativa control 3.63 ±0.18 vs 0.34 ±0.10).

Por otra parte, en el panel C de la figura observamos una maniobra experimental en donde al activar al receptor de dopamina D2 la liberación de GABA se ve disminuida significativamente, un efecto que ya habíamos mostrado, de manera interesante encontramos también que al activar al receptor de dopamina y bloquear a los canales de calcio tipo L en la misma condición el efecto inhibitorio sobre la liberación de GABA no se ve potenciado (área relativa Quinpirol 2.1 ±0.34 vs Nifedipino+Quinpirol 2.08 ±0.31 n.s.). Para descartar la participación de los canales de calcio tipo P/Q tras la activación del receptor D2 mediante experimentos de liberación de GABA podemos ver en el panel D que cuando se activa al receptor y se bloquea a estos canales en la misma preparación la inhibición en la liberación de GABA es aún mayor que cuando sólo se activa a los receptores (área relativa Quinpirol 2.06 ±0.26 vs Quinpirol+ ω-agatoxina TK 1.75 ±0.23 p<0.01). Para clarificar aun más la participación del canal de calcio tipo L en el proceso de liberación del neurotransmisor nos valemos del BAYK, un activador del canal de calcio tipo L que aumenta su latencia, como se puede observar en el panel E de la gráfica, el BAYK generó un aumento en la cantidad de GABA liberado en la terminal cuando se compara con la condición control, pero de manera

muy interesante al incluir en la misma condición el BAYK más el agonista para el receptor D2 se previno el efecto estimulador sobre la liberación de GABA modulada por el canal de calcio tipo L (área relativa BYK 4.73 ± 0.19 vs Quinpirol+BYK 2.38 ± 0.19).

Finalmente para evaluar la participación del canal de calcio tipo L como efector final en el proceso de liberación de neurotransmisor tras la activación del dímero A_{2A}/D_2 , mediante los experimentos de liberación de GABA en la terminal estriado-palidal, observamos en el panel F de la figura que el efecto estimulador se previene de manera muy importante cuando se coactiva al receptor y se bloquea al canal de calcio tipo L (área relativa CGS+Quinpirol 5.97 ± 0.41 vs CGS+Quinpirol+Nifedipino 2.19 ± 0.35 $p < 0.001$).

Figura 17



El efector final de la señalización del dímero A_{2A}/D₂ es el canal de calcio tipo L. **A.** La liberación de GABA estimulada por KCl es dependiente de calcio. **B.** la liberación de GABA inducida por KCl es modulada por los canales P/Q y L. **C-E.** Los receptores D₂ tienen como efector al canal de calcio tipo L. **F.** El dímero A_{2A}/D₂ tiene como efector final al canal de calcio tipo L. *p< 0.05 contra control, **p<0.01 contra control, ***p<0.001 contra control, ###p< 0.001 contra ω-agatoxina TK. &&&p< 0.001 contra BAYK.

Discusión:

1. La entidad dimérica A_{2A}/D2 en el sistema nativo.

Los receptores de siete dominios transmembranales inicialmente fueron considerados como proteínas monoméricas, las cuales únicamente eran capaces de interactuar con su proteína G. Sin embargo, cada vez se hace más clara la idea de que estos receptores pueden formar homodímeros, heterodímeros y una gran variedad de relaciones con otras proteínas a nivel membranaral (Canals, Marcellino et al. 2003). Trabajos realizados mediante experimentos de transferencia de energía en células HEK y de neuroblastoma evidencian la formación de heterómeros de los receptores A_{2A} que indican que estos receptores se pueden organizar en estructuras diméricas, triméricas o multiméricas a las cuales se les atribuyen capacidades funcionales (Canals, Burgueno et al. 2004, Vidi, Chen et al. 2008), a su vez también existe evidencia de la formación de unidades monoméricas entre los receptores de dopamina tipo D2 en transfectos de células Cos-7 (Wurch, Matsumoto et al. 2001) y se ha demostrado mediante experimentos de transferencia de energía que estos establecen unidades funcionales en la membrana celular con un número no menor de 4 protómeros (Guo, Urizar et al. 2008), estos datos sugieren fuertemente la necesidad de que los receptores de 7 dominios transmembranales se asocien en unidades estructuralmente complejas dejando la posibilidad de formar no solo homómeros si no dímeros funcionales.

Cómo hemos planteado con antelación, la dimerización entre los receptores A_{2A} y D2 es un hecho que podría considerarse como un fenómeno que en realidad ocurre, existe evidencia que lo sustenta, caso concreto son los experimentos de transferencia de energía en células HEK-293T, en donde el cotransfecto con ambos receptores muestra una proximidad entre las dos proteínas no mayor a 10nm (Canals, Marcellino et al. 2003), un resultado que si bien es cierto podría ser desestimado por la falta de prueba suficiente que demostrará la existencia del dímero es también cierto bien podría valer para apoyar la existencia de una interacción entre ambas proteínas que llevara implícita la formación no sólo de una unidad dimérica conformacional, sino de una unidad dimérica funcional, otra desventaja que se podría argumentar

contra este resultado es la eminente diferencia que existe entre un sistema de expresión heteróloga, el cual, ciertamente no tendría porque comportarse de la misma manera que el sistema nativo, en este caso la terminal estriado palidal.

Otra evidencia de la existencia del dímero que vale la pena resaltar son los trabajos que aportan sustento de dicha interacción mediante experimentos de Pull down en células HEK-293T y modelado computacional (Ciruela, Burgueno et al. 2004) en donde incluso se proponen los sitios consenso o epítomos de cada uno de los receptores que hacen posible la interacción entre ambos receptores, de nueva cuenta quizás estos resultados se podrían desestimar o considerar con las reservas del caso dada la naturaleza del experimento que como ya acotamos fue realizado en sistemas heterólogos.

Los resultados que presentamos en los experimentos de coinmunoprecipitación de los receptores A_{2A} y D2 sirven como una herramienta más que consideramos es de gran aporte en el campo del entendimiento y la validación del heterodímero A_{2A}/D2, pues cómo se observa en la figura 10 en la maniobra de inmunoprecipitación del receptor A_{2A} el revelado por el método Kodak para el receptor D2 muestra una banda en un peso alrededor de los 90kDa, más interesante aún y en abono de este resultado es el hecho de que al ejecutar la maniobra experimental inversa inmunoprecipitando al receptor D2 y rebelando al receptor A_{2A} por el método de westernblot es posible observar también una banda que aparece en el mismo peso, 90kDa, este resultado por una parte nos deja ver claramente la interacción de ambos receptores en el sistema nativo, un resultado que correlaciona muy bien con lo mostrado por los experimentos anteriores en sistemas de expresión heteróloga y que si bien es cierto no descarta la participación de alguna otra proteína que sirva de puente entre ambos receptores tampoco invalida la posibilidad de la existencia de una interacción proteína-proteína entre ambos receptores en la terminal estriado-palidal, en la cual se sabe se encuentran colocalizando abundantemente en neuronas encefalinérgicas (Svenningsson, Le Moine et al. 1997, Svenningsson, Le Moine et al. 1999).

2. La vía de señalización del receptor A_{2A}/D2

Experimentos de liberación de [³H]GABA en la terminal estriado palidal, son de gran ayuda para evaluar desde diversas aristas la forma en la que el dímero A_{2A}/D2 señala, con estos experimentos nos dimos a la tarea de disecar farmacológicamente la ruta de señalización en extenso. Primeramente al evaluar la respuesta fisiológica de cada uno de los receptores encontramos que la activación del receptor D2 al ser activado en condiciones de depleción farmacológica de la dopamina endógena con reserpina se presenta un efecto inhibitorio sobre la liberación de GABA como lo propone Florán y colaboradores en 2005 (Florán, Gonzalez et al. 2005), en este mismo manuscrito nuestro grupo de trabajo evaluó la actividad del receptor A_{2A}, en este apartado se demostró que los receptores A_{2A} no son capaces de generar una respuesta o modificación de GABA en la terminal estriado-palidal, sin embargo al coactivar ambos receptores es posible apreciar un aumento significativo en la liberación, un dato que resulta por demás interesante al revelar que aparentemente, al menos en nuestro paradigma experimental el receptor A_{2A} no es capaz de de iniciar una respuesta fisiológica rompiendo con el concepto clásico relativo a este en el que se propone tras su activación acontece una respuesta estimuladora, que de hecho ocurre pero que se hace indispensable se encuentre coactivado el receptor D2. Un resultado de esta naturaleza, creemos refuerza la idea de la existencia de una unidad dimérica funcional, Tozzi y colaboradores en 2007 también dan cuenta de este fenómeno en el cual mediante experimentos de registro electrofisiológico en el núcleo estriado observan que tras estimular a los receptores A_{2A} estos no son capaces de alterar la liberación espontánea de glutamato, logrando modificar la liberación únicamente al coactivar a los receptores de dopamina D2 (Tozzi, Tschertter et al. 2007).

Del resultado de esta interacción se desprende una incógnita que es tal vez más interesante explorar y resolver, la vía de transducción de señales del dímero funcional, se propone que resultado de una interacción dimérica los mecanismos de señalización de los receptores podrían cambiar, caso concreto en acople a las proteínas G, en el caso de los receptores A_{2A} es un concepto aceptado el hecho de que

tras su activación estos se acoplan a una proteína $G_{s/olf}$ con la consecuente activación de la adenilato ciclasa (Kull, Svenningsson et al. 2000, Shindou, Nonaka et al. 2002, Almeida, Rodrigues et al. 2003), mientras que los receptores D2 al ser activados señalizan por una proteína $G_{i/o}$ que a su vez ejerce su efecto inhibitorio sobre la adenilato ciclasa de las neuronas estriatales (Onali, Olanas et al. 1985). Con base en estudios funcionales y moleculares existen trabajos que proponen el dímero $A_{2A}/D2$ puede señalizar por medio de un acople a una proteína $G_{s/olf}$, una proteína de tipo inhibitoria $G_{i/o}$ e incluso por medio de un acople a una proteína $G_{q/11}$. Sin embargo y como lo planteamos no se tiene evidencia suficiente para sustentar estas ideas, con esto dicho iniciamos con el análisis de la ruta de señalización del dímero mediante experimentos de liberación de [3H]GABA en la terminal estriado palidal para esto, los experimentos en donde es utilizado el fármaco N-etilmaleimida [$10 \mu M$] un agente que se encarga de bloquear las proteínas $G_{i/o}$, encontramos que el uso concomitante de este fármaco en la preparación donde se coactiva a los receptores $A_{2A}/D2$ no modifica la liberación de GABA lo que nos indica que la vía de señalización por la cual el dímero funciona no es a través de una proteína $G_{i/o}$, dejando además la posibilidad de excluir al receptor D2 como responsable de activar a las proteínas $G_{i/o}$ en el proceso de señalización de esta unidad dimérica y abriendo la posibilidad de un acople dirigido a otra proteína G que bien podría ser una $G_{q/11}$ ó una proteína de tipo $G_{s/olf}$, más aún, esta idea se refuerza de manera muy importante si tomamos en consideración los estudios realizados por Giusti y colaboradores en 2003 en donde señala que a pesar de que se sabe la N-etilmaleimida bloquea a las proteínas $G_{i/o}$, en el caso de los receptores A_{2A} este fármaco disminuye de manera dosis dependiente la unión del receptor por su proteína $G_{s/olf}$ (Giusti, Taddei et al. 2003), dejando con estos datos como la más probable y única posibilidad a una proteína $G_{q/11}$ en el mecanismo de señalización de ambos receptores.

Para poder evaluar la participación de los segundos mensajeros tras activar las proteínas $G_{q/11}$ por principio de cuentas, bloqueamos a la PLC, toda vez que no tenemos herramienta farmacológica para bloquear a las proteínas $G_{q/11}$ creemos que el bloquear a la PLC nos puede dar un juicio de valor bastante certero de la posible interacción entre el dímero activado y la proteína G, en los experimentos de

liberación encontramos que al bloquear a la PLC con U73122 [10 μ M] el efecto estimulador sobre la liberación de GABA modulado por la coactivación de los receptores se ve prevenido completamente, dejando cómo analizamos en el apartado de resultados los valores sin diferencia contra la condición sin tratamiento. Este resultado nos sugiere fuertemente el acople de los receptores a una proteína $G_{q/11}$ con una subsecuente activación de la vía PLC.

Para validar esta teoría era indispensable descartar la posibilidad de un acople del dímero activado a una proteína $G_{s/olf}$, esto lo pudimos evaluar a través del bloqueo de la PKA mediante el H89 [10 μ M], proponiendo en esta maniobra experimental el hecho conocido que tras la activación de un receptor acoplado a una proteína $G_{s/olf}$ uno de sus efectores directos es la PKA desencadenando la vía de señalización adenilato ciclasa \rightarrow PKA y en este caso en la terminal estriado palidal de resultar cierto estimular la liberación de GABA. En correlación con los resultados discutidos en el párrafo anterior encontramos que el bloqueo de la PKA con H89 no fue capaz de prevenir el efecto estimulador sobre la liberación de GABA, este resultado correlaciona perfecto y tras su análisis no deja como ruta de señalización del dímero la vía de la $G_{q/11} \rightarrow$ PLC, aportando información valiosa para el entendimiento del mecanismo de acción de la estructural dimérica funcional constituida por los receptores $A_{2A}/D2$.

Para aclarar más este hallazgo y continuar con la análisis farmacológica de la vía de señalización una vez conocida la participación de una proteína $G_{q/11}$ nos planteábamos al menos dos posibilidades en la ruta de señalización, la primera, la activación de la PKC con una subsecuente entrada de calcio a través de un canal operado por voltaje y la segunda, un aumento en la formación de IP3 y una movilización de calcio de compartimentos intracelulares. utilizando como herramienta farmacológica al 2-APB [10 μ M] un bloqueador de los receptores a IP3 intracitoplásmicos, en los experimentos de liberación de GABA, encontramos que el efecto estimulador no se vio prevenido descartando esta posibilidad, un fenómeno que nos llevaría entonces a la siguiente etapa experimental para evaluar la participación de la PKC, otro efector de la PLC activada y que basado en las

evidencias funcionales de este dímero nos parecía pertinente valorar, cómo se puede apreciar en los resultados tras la activación de los receptores A_{2A}/D2 y el bloque de la PKC en la misma preparación, se observa que se previene por completo el efecto e efecto estimulador de la coactivación, dejándonos un dato claro de la participación de esta cinasa y contribuyendo en completar disección de la vía de señalización que hasta este punto podríamos decir es $G_{q/11} \rightarrow PLC \rightarrow PKC$ dejando como posible efector final a un canal de calcio operado por voltaje.

Estos hallazgos ejemplifican muy bien lo que ocurre al activar a una unidad dimérica funcional, en donde se propone que al activar al dímero la respuesta y el acople a las proteínas G “clásicas” para cada receptor pueden cambiar o no ser las mismas, generando también un cambio en la vía de señalización (Ferre, Ciruela et al. 2007), en el caso concreto de los receptores que estamos estudiando que como ya hemos revisado señalizan por una G_{s/olf} o una G_{i/o} dependiendo si se trata del receptor A_{2A} o D2 respectivamente y como analizamos en la figura 12 hay un acople a una proteína de tipo G_{q/11}, dando sustento con estos resultados a un fenómeno que en específico se presumía desde hace tiempo para este par de receptores pero que no se había podido evidenciar hasta la fecha.

Con estos resultados sería útil conocer la participación de los canales de calcio en el proceso de liberación de neurotransmisor en la terminal estriado-palidal, nos dimos a la tarea de elucidar la participación del canal de calcio tipo L a demás de los canales de calcio tipo P/Q. Mediante experimentos de liberación de GABA como primera maniobra experimental, evaluamos la dependencia de calcio en el proceso de liberación de neurotransmisor, en nuestro experimento en donde retiramos el calcio de la solución de Krebs podemos apreciar que la liberación evocada por una solución de potasio [15mM] se encuentra disminuida de manera muy marcada, dejando claro el hecho de que es indispensable la participación del calcio en el proceso de despolarización en esta terminal estriado-palidal, dicho de otra forma la liberación de GABA en la terminal estriado palidal es dependiente de calcio, continuando con la búsqueda del canal de calcio involucrado en el proceso de liberación de neurotransmisor en la terminal estriado palidal mediante ω -agatoxina TK, un

bloqueador de los canales de calcio tipo P/Q, observamos que el efecto sobre la liberación inducida por potasio se ve prevenido, al menos en parte y además también podemos ver que el bloqueo de los canales de calcio tipo L con nifedipino [10 μ M], también produce una disminución en la liberación inducida por potasio, lo interesante en este par de resultados radica en que parecería que la liberación en la terminal estriado-palidal se encuentra modulada por ambos tipos de canales iónicos y que cada uno de ellos aporta una parte en la totalidad del proceso de liberación, dejando claro que este efecto fisiológico no ocurre por la acción de un solo canal.

En relación al receptor de dopamina D2 podemos notar que al activarlo con un agonista D2, quinpirol y bloquear al canal de calcio tipo L con nifedipino, el efecto inhibitorio sobre la liberación de GABA no se ve potenciado, indicándonos que muy probablemente cómo lo propone Hernandez-Lopez en el 2000 (Hernandez-Lopez, Tkatch et al. 2000) mediante experimentos de registro electrofisiológico, es este canal en que se encuentra mediando esta actividad igual que cómo sucede el soma de la neurona de proyección estriado palidal. Este resultado además correlaciona muy bien con el que obtenemos al aumentar la latencia del canal de calcio tipo L farmacológicamente con el BAYK, en donde se aprecia en la condición en la que se agrega BAYK a la condición control, la liberación de neurotransmisor se ve incrementada un efecto esperado cuando se considera la dependencia de calcio en el proceso de liberación de neurotransmisor en la terminal, más importante resulta aún el hecho de que al estimular al receptor D2 e incluir en la misma preparación el BAYK para aumentar la latencia del canal, es efecto estimulatorio que logra el fármaco por sí solo se previene con la activación del receptor reforzando el resultado encontrado con el nifedipino, el bloqueador de los canales de calcio tipo L.

La siguiente maniobra experimental sería explorar la posibilidad de que el canal de calcio tipo L fuera el efector del dímero $A_{2A}/D2$ activado ya que hasta este punto y con los resultados revisados, además de tomar en consideración los resultados mostrados por Azdad y colaboradores en el 2009 en donde con la ayuda de experimentos de registro electrofisiológico en el núcleo estriado ventral, propusieron que este par de receptores señalizaban mediante un canal de calcio tipo L (Azzad,

Gall et al. 2009). Es prudente decir que los experimentos en paralelo para el receptor A_{2A} con los bloqueadores de calcio no se llevaron a cabo toda vez que como ya analizamos este no es capaz de señalizar cuando se activa por separado. Así pues observamos que tras la activación del receptor A_{2A} y D2 en la terminal estriado-palidal la cantidad de GABA liberado cuando se incluye en la preparación al bloqueador del canal de calcio tipo L en efecto inhibitorio se ve completamente ocluido dejando los valores de área de liberación muy cercanos a los valores de liberación cuando se bloquea únicamente al canal de calcio en la preparación, un resultado que correlaciona muy bien con lo propuesto por Azdad en 2009.

Esta serie experimental nos permite establecer que la vía de señalización del dímero $A_{2A}/D2$, proponer entonces que la ruta de transducción de señales completa que siguen este par de receptores es después de acoplarse a una proteína $G_{q/11}$ se activa a la PLC esta a su vez activaría a la PKC llevando a una modulación de los canales de calcio tipo L, permitiendo un influjo masivo de calcio a la terminal y generando como respuesta la salida del neurotransmisor.

3. Papel de los segundos mensajeros y la CAMKII en la interacción $A_{2A}/D2$

Con la finalidad de ahondar más en la vía de transducción de señales del dímero funcional realizamos los experimentos de segundos mensajeros en sinaptosomas de globo pálido, por principio de cuentas observamos en experimentos de acumulación de AMPc cuando activamos al receptor D2 en el sinaptosomas de globo pálido no hay un aumento importante en la formación de AMPc, ocurre lo mismo cuando activamos únicamente a los receptores A_{2A} , no se aprecia un aumento en la formación de AMPc, sin embargo la activación de ambos receptores produjo un aumento significativo en la formación de AMPc, estos resultados podrían correlacionarse con lo observado en los experimentos de liberación de GABA en donde si recordamos es necesario que los dos receptores se encuentren coactivados, ahora bien en los experimentos de liberación de GABA la coactivación de los receptores $A_{2A}/D2$ estos señalizan a través de la PLC y no de la PKA, ¿cómo se podría explicar entonces el aumento en la formación de AMPc en los sinaptosomas cuando se coactiva al dímero? La respuesta yace en la condición en la que se

encuentra la terminal, es decir cuando esta se encuentra despolarizada parece que el dímero señala a través de la PLC, mientras que en condiciones no despolarizantes el dímero señala a través de la PKA, esto lo podemos afirmar con el sustento en los siguientes experimentos en donde al someter al sinaptosoma a una condición despolarizante incluyendo en la preparación K^+ [15nM], el efecto estimulador de la activación del dímero sobre la formación de AMPc se previene por completo. Esta idea se refuerza cuando realizamos los experimentos de acumulación de fosfoinosítidos también en sinaptosomas de globo pálido donde al activar al receptor D2 se puede ver se genera un aumento importante en la acumulación de fosfoinosítidos, un resultado que por cierto correlaciona muy bien con lo propuesto con anterioridad por Hernandez-Lopez en el 2000 (Hernandez-Lopez, Tkatch et al. 2000); por otra parte también podemos apreciar que la activación del receptor A_{2A} no tuvo impacto en la formación de fosfoinosítidos, quedándonos claro que mientras el receptor A_{2A} se active solo no es capaz de generar una respuesta. Volviendo al tema del cambio o switch de la vía de señalización en condiciones despolarizantes y no despolarizantes nos damos cuenta que la activación de ambos receptores en condiciones no despolarizantes no produce un efecto en la formación de fosfoinosítidos, por el contrario, cuando se somete la terminal a condiciones despolarizantes es entonces que este efecto estimulador de la formación de fosfoinosítidos se revierte, analizando estos datos reafirmamos que la vía de señalización que el dímero escoge es totalmente dependiente de la condición en la que se encuentra la terminal.

Avalos-Fuentes (2013) propuso el papel de la CaMKII como modulador de la actividad de los dímeros, específicamente el dímero D1/D3 (Avalos-Fuentes, Loya-Lopez et al. 2013), en el caso del dímero $A_{2A}/D2$ pudimos encontrar que la CaMKII juega un papel trascendental en la vía de señalización que como ya dijimos puede modularse por dos vías distintas dependiendo de la condición de la terminal, como apreciamos en los experimentos de acumulación de AMPc en la figura 13 cuando sometemos los sinaptosomas a una condición de despolarización, la CaMKII como respuesta se activa, este aumento en su actividad la lleva a modular al dímero en forma tal que la cantidad de AMPc no aumenta, como lo comprobamos cuando al

bloquearla farmacológicamente en condiciones de despolarización en donde los niveles de AMPc se incrementan a diferencia de cuando no se encuentra bloqueada y totalmente activa. Además de este resultado como mostramos en los experimentos de formación de fosfoinosítidos en la condición experimental en donde la CaMKII se encuentra activa por la condición despolarizante la coactivación de ambos receptores produce un efecto estimulador sobre la formación de fosfoinosítidos de manera significativa, aún más interesante resulta el hecho que se observa en esa misma serie experimental en donde al bloquear a la CaMKII en condiciones despolarizantes el efecto estimulador se ve completamente prevenido. Todos estos resultados dejan claro el rol central de la CaMKII en el proceso de transducción de señales del dímero A_{2A}/D2 en la terminal estriado palidal.

Podría argumentarse que este efecto que observamos en los segundos mensajeros no necesariamente tendría un impacto en la respuesta fisiológica de la terminal, es decir la liberación del neurotransmisor, para comprobar o descartar esta idea, como vemos en la figura 14 con los experimentos de liberación de [³H]GABA, observamos que los experimentos de AMPc y fosfoinosítidos nos brindan información muy importante, en el experimento de liberación cuando los receptores se encuentran coactivados el efecto estimulador sobre la liberación de GABA se ve potenciado, llama mucho la atención este hecho, pero son más reveladores la serie de resultados que demuestran que en la condición experimental en donde la CaMKII se encuentra bloqueada farmacológicamente el dímero deja de señalar por la vía de la PLC y en su lugar señala por medio de la adenilato ciclasa → AMPc → PKA, esto indica que efectivamente, como ocurre en los experimentos de segundos mensajeros entiéndase AMPc y fosfoinosítidos hay un relevo o switch en la vía de señalización dejándonos claro el papel tan preponderante que tiene la CaMKII en la modulación de la actividad de los receptores y de su ruta de señalización, este fenómeno ilustra la importancia de otras proteínas en el contexto de la funcionalidad dimerica, en su momento Woods y colaboradores planteaban la posibilidad de que la CaM interactuara con el dímero y que lo pudiera modular, todo esto basado en estudios de proteómica y no funcionales (Woods, Marcellino et al. 2008), así también Navarro en 2012 propondría que la proteína NCS-1 también interacciona con estos receptores

dejando en el terreno de la especulación las posibles implicaciones funcionales (Navarro, Hradsky et al. 2012).

Son relevantes también los resultados que muestran que la CaMKII no modula la actividad de los receptores por separado, a este respecto es tentador pensar que si la CaMKII es capaz de regular la actividad del dímero funcional, también lo haga con los receptores por separado, sin embargo esto no ocurre, tal vez la CaMKII regula al dímero A_{2A}/D2 porque de alguna forma encuentra un sitio entre ambos receptores lo que les permite generar un cambio conformacional y en consecuencia un cambio en la ruta de señalización.

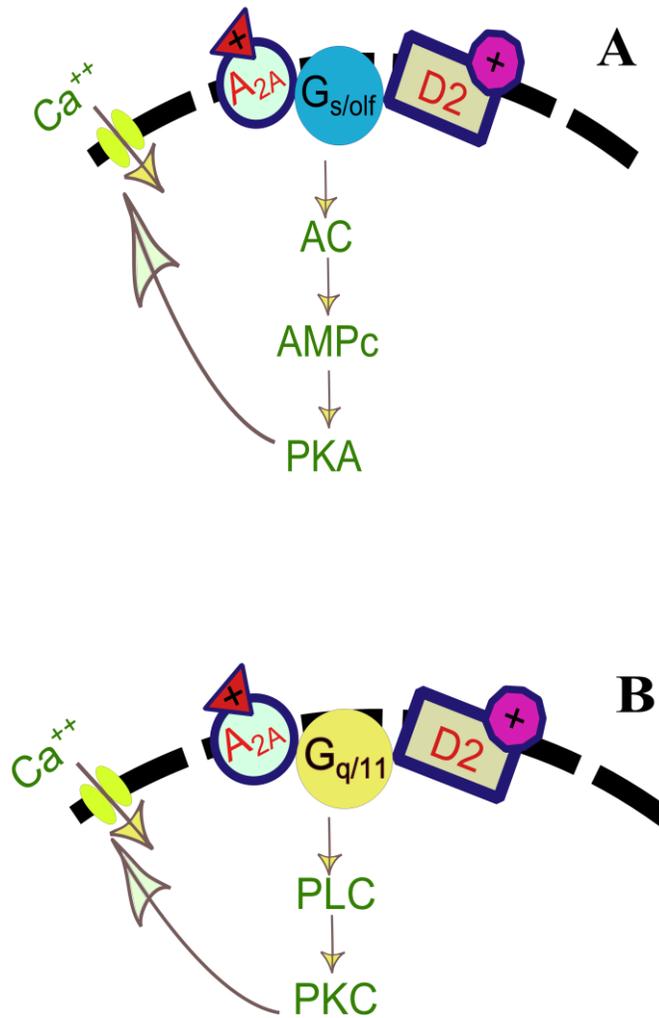
4. El dímero A_{2A}/D2 en la enfermedad de Parkinson.

Sabemos que los receptores A_{2A} y D2 tienen un papel toral en la modulación del movimiento, en el modelo de Párkinson experimental que utilizamos encontramos que la activación del dímero funcional produce un aumento importante en la respuesta fisiológica, cuando observamos los experimentos de liberación de GABA en la rata lesionada con 6-OHDA apreciamos que la liberación del neurotransmisor aumenta considerablemente cuando se compara con la condición en la normal o sin lesión, esto puede tener su génesis en diferentes factores uno de ellos podría ser el conocido aumento en la sensibilidad de los receptores D2 en modelos de denervación dopaminérgica (Creese, Burt et al. 1977) que podrían estar generando este aumento en la respuesta estimuladora, otra explicación para este efecto es el aumento de la sensibilidad de la adenilato ciclasa en ratas hemiparkinsonicas lesionadas con 6-OHDA demostrado por Rangel-Barajas en 2008 y aunque este fenómeno ocurre en la sustancia nigra *pars reticulata* no existe motivo para excluir esta posibilidad en la terminal estriado palidal (Rangel-Barajas, Silva et al. 2008). Finalmente una tercera posibilidad sería la combinación de los dos fenómenos antes expuestos los que podrían llevar a este aumento en la respuesta fisiológica, una respuesta que podría tener implicaciones no sólo a nivel del párkinson experimental sino en la enfermedad de párkinson, su tratamiento y su evolución cómo se propone en diversos manuscritos (Tanganelli, Sandager Nielsen et al. 2004, Antonelli, Fuxe et al. 2006).

Sólo nos resta acotar el papel de la CaMKII en la condición del Párkinson experimental, en este punto lo primero que observamos es que el bloqueo de la CaMKII en la denervación dopaminérgica no modifica la liberación del neurotransmisor cuando se coactiva al dímero, explicar esto resulta complicado, sin embargo, con base en lo observado en la respuesta incrementada de liberación de GABA en el modelo de denervación cuando se coactiva a los receptores y que cómo acabamos de analizar podría deberse a tres fenómenos diferentes, sean precisamente estos fenómenos que ya *per se* generan una respuesta exacerbada en la liberación de GABA los que no nos permitan diferenciar el papel funcional de la CaMKII ó por otra parte y quizás más probablemente ocurra una pérdida de funcionalidad de la CaMKII en la denervación dopaminérgica cómo lo propone Avalos-Fuentes.

Otro hecho que nos permite inclinarnos hacia esta idea que acabamos de plantear es el cambio en la vía de señalización del dímero en la lesión dopaminérgica, que como vimos en condiciones normales y despolarizantes en a través de la PLC y no por vía adenilato ciclasa PKA (figura 18), en esta condición la vía que selecciona el dímero es la de la adenilato ciclasa como ocurre cuando en la maniobra experimental se bloquea a la CaMKII una maniobra que bien podría mimetizar la falta de funcionalidad de la CaMKII y que sin duda podría explicar lo observado.

Figura 18



El estado de despolarización de la terminal determina la vía de señalización del dímero A_{2A}/D₂.
A. Cuando la terminal no se encuentra despolarizada y la CaMKII se encuentra menos activa el dímero señaliza mediante el acople a una proteína G_{s/olf}→Ac→PKA. B. En condiciones despolarizantes en donde la CaMKII se encuentra más activa el dímero señaliza por un acople a una proteína G_{q/11}→PLC→PKC.

Conclusiones:

- Los receptores A_{2A} y D2 de las terminales estriado-palidales establecen una interacción de tipo proteína-proteína congruente con la idea de un dímero estructural y funcional.
- La coactivación de receptores $A_{2A}/D2$ estimula la vía de la $Gq \rightarrow PLC \rightarrow PKC$ ó $Gs \rightarrow AC \rightarrow PKA$ dependiendo de la actividad de la CaMKII teniendo como efector final a los canales de calcio tipo L.
- La interacción $A_{2A}/D2$ se mantiene en la denervación usando solo la vía $Gs \rightarrow AC \rightarrow PKA$.

Bibliografía:

Aceves, J., B. Floran, A. Sierra and S. Mariscal (1995). "D-1 receptor mediated modulation of the release of gamma-aminobutyric acid by endogenous dopamine in the basal ganglia of the rat." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **19**(5): 727-739.

Agnati, L. F., S. Ferre, S. Genedani, G. Leo, D. Guidolin, M. Filaferro, P. Carriba, V. Casado, C. Lluís, R. Franco, A. S. Woods and K. Fuxe (2006). "Allosteric modulation of dopamine D2 receptors by homocysteine." J Proteome Res **5**(11): 3077-3083.

Agnati, L. F., S. Ferre, C. Lluís, R. Franco and K. Fuxe (2003). "Molecular mechanisms and therapeutical implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons." Pharmacol Rev **55**(3): 509-550.

Agnati, L. F., K. Fuxe, I. Zini, P. Lenzi and T. Hokfelt (1980). "Aspects on receptor regulation and isoreceptor identification." Med Biol **58**(4): 182-187.

Agnati, L. F., K. G. Fuxe, L. B. Goncharova and A. O. Tarakanov (2008). "Receptor mosaics of neural and immune communication: Possible implications for basal ganglia functions." Brain Research Reviews **58**(2): 400-414.

Agnati, L. F., D. Guidolin, G. Leo, C. Carone, S. Genedani and K. Fuxe (2010). "Receptor–receptor interactions: A novel concept in brain integration." Progress in Neurobiology **90**(2): 157-175.

Agnati, L. F., G. Leo, S. Genedani, N. Andreoli, D. Marcellino, A. Woods, L. Piron, D. Guidolin and K. Fuxe (2008). "Structural plasticity in G-protein coupled receptors as demonstrated by the allosteric actions of homocysteine and computer-assisted analysis of disordered domains." Brain Research Reviews **58**(2): 459-474.

Almeida, T., R. J. Rodrigues, A. de Mendonça, J. A. Ribeiro and R. A. Cunha (2003). "Purinergic P2 receptors trigger adenosine release leading to adenosine A2A receptor activation and facilitation of long-term potentiation in rat hippocampal slices." Neuroscience **122**(1): 111-121.

Antonelli, T., K. Fuxe, L. Agnati, E. Mazzoni, S. Tanganelli, M. C. Tomasini and L. Ferraro (2006). "Experimental studies and theoretical aspects on A2A/D2 receptor interactions in a model of Parkinson's disease. Relevance for L-dopa induced dyskinesias." Journal of the Neurological Sciences **248**(1–2): 16-22.

Avalos-Fuentes, A., S. Loya-Lopez, A. Flores-Perez, S. Recillas-Morales, H. Cortes, F. Paz-Bermudez, J. Aceves, D. Erlij and B. Floran (2013). "Presynaptic CaMKII α modulates dopamine D3 receptor activation in striatonigral terminals of the rat brain in a Ca(2)(+) dependent manner." Neuropharmacology **71**: 273-281.

Azdad, K., D. Gall, A. S. Woods, C. Ledent, S. Ferre and S. N. Schiffmann (2009). "Dopamine D2 and adenosine A2A receptors regulate NMDA-mediated excitation in accumbens neurons through A2A-D2 receptor heteromerization." Neuropsychopharmacology **34**(4): 972-986.

Barraco, R. A., V. L. Coffin, H. J. Altman and J. W. Phillis (1983). "Central effects of adenosine analogs on locomotor activity in mice and antagonism of caffeine." Brain Res **272**(2): 392-395.

Bofill-Cardona, E., O. Kudlacek, Q. Yang, H. Ahorn, M. Freissmuth and C. Nanoff (2000). "Binding of calmodulin to the D2-dopamine receptor reduces receptor signaling by arresting the G protein activation switch." J Biol Chem **275**(42): 32672-32680.

Borroto-Escuela, D. O., W. Romero-Fernandez, A. O. Tarakanov, F. Ciruela, L. F. Agnati and K. Fuxe (2011). "On the existence of a possible A2A-D2-beta-Arrestin2 complex: A2A agonist modulation of D2 agonist-induced beta-arrestin2 recruitment." J Mol Biol **406**(5): 687-699.

Borroto-Escuela, D. O., W. Romero-Fernandez, A. O. Tarakanov, M. Gómez-Soler, F. Corrales, D. Marcellino, M. Narvaez, M. Frankowska, M. Flajolet, N. Heintz, L. F. Agnati, F. Ciruela and K. Fuxe (2010). "Characterization of the A2AR–D2R interface: Focus on the role of the C-terminal tail and the transmembrane helices." Biochemical and Biophysical Research Communications **402**(4): 801-807.

Bouthenet, M. L., E. Souil, M. P. Martres, P. Sokoloff, B. Giros and J. C. Schwartz (1991). "Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA." Brain Res **564**(2): 203-219.

Braun, A. P. and H. Schulman (1995). "The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function." Annu Rev Physiol **57**: 417-445.

Braun, S. and A. Levitzki (1979). "Adenosine receptor permanently coupled to turkey erythrocyte adenylate cyclase." Biochemistry **18**(10): 2134-2138.

Bunzow, J. R., H. H. Van Tol, D. K. Grandy, P. Albert, J. Salon, M. Christie, C. A. Machida, K. A. Neve and O. Civelli (1988). "Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA." Nature **336**(6201): 783-787.

Canals, M., J. Burgueno, D. Marcellino, N. Cabello, E. I. Canela, J. Mallol, L. Agnati, S. Ferre, M. Bouvier, K. Fuxe, F. Ciruela, C. Lluís and R. Franco (2004). "Homodimerization of adenosine A2A receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer." J Neurochem **88**(3): 726-734.

Canals, M., D. Marcellino, F. Fanelli, F. Ciruela, P. de Benedetti, S. R. Goldberg, K. Neve, K. Fuxe, L. F. Agnati, A. S. Woods, S. Ferre, C. Lluís, M. Bouvier and R. Franco (2003). "Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer." J Biol Chem **278**(47): 46741-46749.

Ciruela, F., J. Burgueno, V. Casado, M. Canals, D. Marcellino, S. R. Goldberg, M. Bader, K. Fuxe, L. F. Agnati, C. Lluís, R. Franco, S. Ferre and A. S. Woods (2004). "Combining mass spectrometry and pull-down techniques for the study of receptor heteromerization. Direct epitope-epitope electrostatic interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors." Anal Chem **76**(18): 5354-5363.

Ciruela, F., V. Fernandez-Duenas, J. Llorente, D. Borroto-Escuela, M. L. Cuffi, L. Carbonell, S. Sanchez, L. F. Agnati, K. Fuxe and C. I. Tasca (2012). "G protein-coupled receptor oligomerization and brain integration: Focus on adenosinergic transmission." Brain Res **1476**: 86-95.

Conklin, B. R. and H. R. Bourne (1993). "Structural elements of G alpha subunits that interact with G beta gamma, receptors, and effectors." Cell **73**(4): 631-641.

Correa, M., A. Wisniecki, A. Betz, D. R. Dobson, M. F. O'Neill, M. J. O'Neill and J. D. Salamone (2004). "The adenosine A2A antagonist KF17837 reverses the locomotor suppression and tremulous jaw movements induced by haloperidol in rats: possible relevance to parkinsonism." Behav Brain Res **148**(1-2): 47-54.

Creese, I., D. R. Burt and S. H. Snyder (1977). "Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity." Science **197**(4303): 596-598.

Dal Toso, R., B. Sommer, M. Ewert, A. Herb, D. B. Pritchett, A. Bach, B. D. Shivers and P. H. Seeburg (1989). "The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing." EMBO J **8**(13): 4025-4034.

Dayne Mayfield, R., G. Larson, R. A. Orona and N. R. Zahniser (1996). "Opposing actions of adenosine A2a and dopamine D2 receptor activation on GABA release in the basal ganglia: evidence for an A2a/D2 receptor interaction in globus pallidus." Synapse **22**(2): 132-138.

De Keyser, J., H. Walraevens, J.-P. De Backer, G. Ebinger and G. Vauquelin (1989). "D2 dopamine receptors in the human brain: heterogeneity based on differences in guanine nucleotide effect on agonist binding, and their presence on corticostriatal nerve terminals." Brain Research **484**(1-2): 36-42.

Dunwiddie, T. V. and S. A. Masino (2001). "The role and regulation of adenosine in the central nervous system." Annu Rev Neurosci **24**: 31-55.

Emson, P. C. (2007). "GABA(B) receptors: structure and function." Prog Brain Res **160**: 43-57.

Erondu, N. E. and M. B. Kennedy (1985). "Regional distribution of type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in rat brain." J Neurosci **5**(12): 3270-3277.

Ferguson, S. S. (2001). "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling." Pharmacol Rev **53**(1): 1-24.

Fernandez-Duenas, V., M. Gomez-Soler, K. A. Jacobson, S. T. Kumar, K. Fuxe, D. O. Borroto-Escuela and F. Ciruela (2012). "Molecular determinants of A2AR-D2R allosterism: role of the intracellular loop 3 of the D2R." J Neurochem **123**(3): 373-384.

Ferre, S., F. Ciruela, C. Quiroz, R. Lujan, P. Popoli, R. A. Cunha, L. F. Agnati, K. Fuxe, A. S. Woods, C. Lluís and R. Franco (2007). "Adenosine receptor heteromers and their integrative role in striatal function." ScientificWorldJournal **7**: 74-85.

Ferre, S., F. Ciruela, A. S. Woods, C. Lluís and R. Franco (2007). "Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system." Trends Neurosci **30**(9): 440-446.

Ferre, S., B. B. Fredholm, M. Morelli, P. Popoli and K. Fuxe (1997). "Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia." Trends Neurosci **20**(10): 482-487.

Ferre, S., M. Herrera-Marschitz, M. Grabowska-Anden, M. Casas, U. Ungerstedt and N. E. Anden (1991). "Postsynaptic dopamine/adenosine interaction: II. Postsynaptic dopamine agonism and adenosine antagonism of methylxanthines in short-term reserpinized mice." Eur J Pharmacol **192**(1): 31-37.

Ferre, S., M. Herrera-Marschitz, M. Grabowska-Anden, U. Ungerstedt, M. Casas and N. E. Anden (1991). "Postsynaptic dopamine/adenosine interaction: I. Adenosine analogues inhibit dopamine D2-mediated behaviour in short-term reserpinized mice." Eur J Pharmacol **192**(1): 25-30.

Ferre, S., C. Quiroz, A. S. Woods, R. Cunha, P. Popoli, F. Ciruela, C. Lluís, R. Franco, K. Azdad and S. N. Schiffmann (2008). "An update on adenosine A2A-dopamine D2 receptor interactions: implications for the function of G protein-coupled receptors." Curr Pharm Des **14**(15): 1468-1474.

Ferre, S., G. von Euler, B. Johansson, B. B. Fredholm and K. Fuxe (1991). "Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 7238-7241.

Ferre, S., A. S. Woods, G. Navarro, M. Aymerich, C. Lluís and R. Franco (2010). "Calcium-mediated modulation of the quaternary structure and function of adenosine A2A-dopamine D2 receptor heteromers." Curr Opin Pharmacol **10**(1): 67-72.

Fields, R. D. and G. Burnstock (2006). "Purinergetic signalling in neuron-glia interactions." Nat Rev Neurosci **7**(6): 423-436.

Floran, B., L. Floran, A. Sierra and J. Aceves (1997). "D2 receptor-mediated inhibition of GABA release by endogenous dopamine in the rat globus pallidus." Neurosci Lett **237**(1): 1-4.

Floran, B., B. Gonzalez, L. Floran, D. Erlij and J. Aceves (2005). "Interactions between adenosine A(2a) and dopamine D2 receptors in the control of [(3)H]GABA release in the globus pallidus of the rat." Eur J Pharmacol **520**(1-3): 43-50.

Fredholm, B. B., I. J. AP, K. A. Jacobson, K. N. Klotz and J. Linden (2001). "International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors." Pharmacol Rev **53**(4): 527-552.

Fredholm, B. B., G. Arslan, L. Halldner, B. Kull, G. Schulte and W. Wasserman (2000). "Structure and function of adenosine receptors and their genes." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **362**(4-5): 364-374.

Fredholm, B. B., R. A. Cunha and P. Svenningsson (2003). "Pharmacology of adenosine A2A receptors and therapeutic applications." Curr Top Med Chem **3**(4): 413-426.

Fredholm, B. B., Y. Chern, R. Franco and M. Sitkovsky (2007). "Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling." Prog Neurobiol **83**(5): 263-276.

Fresco, P., C. Diniz and J. Goncalves (2004). "Facilitation of noradrenaline release by activation of adenosine A(2A) receptors triggers both phospholipase C and adenylate cyclase pathways in rat tail artery." Cardiovasc Res **63**(4): 739-746.

Fresco, P., J. M. Oliveira, F. Kunc, A. S. Soares, C. Rocha-Pereira, J. Goncalves and C. Diniz (2007). "A2A adenosine-receptor-mediated facilitation of noradrenaline release in rat tail artery involves protein kinase C activation and betagamma subunits formed after alpha2-adrenoceptor activation." Neurochem Int **51**(1): 47-56.

Fuxe, K., S. Ferre, M. Zoli and L. F. Agnati (1998). "Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia." Brain Res Brain Res Rev **26**(2-3): 258-273.

Fuxe, K., D. Marcellino, D. Guidolin, A. S. Woods and L. Agnati (2009). "Brain receptor mosaics and their intramembrane receptor-receptor interactions: molecular integration in transmission and novel targets for drug development." J Acupunct Meridian Stud **2**(1): 1-25.

George, S. R., B. F. O'Dowd and S. P. Lee (2002). "G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery." Nat Rev Drug Discov **1**(10): 808-820.

Giusti, L., S. Taddei, F. Ceccarelli, S. Chericoni, G. Bigini, A. Lucacchini and M. R. Mazzoni (2003). "Alkylation of sulfhydryl groups on Galpha(s/olf) subunits by N-ethylmaleimide: regulation by guanine nucleotides." Biochim Biophys Acta **1613**(1-2): 7-14.

Guo, W., E. Urizar, M. Kralikova, J. C. Mobarec, L. Shi, M. Filizola and J. A. Javitch (2008). "Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels." EMBO J **27**(17): 2293-2304.

Gurevich, V. V. and E. V. Gurevich (2008). "GPCR monomers and oligomers: it takes all kinds." Trends Neurosci **31**(2): 74-81.

Haas, H. L. and O. Selbach (2000). "Functions of neuronal adenosine receptors." Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol **362**(4-5): 375-381.

Hauber, W., P. Neuscheler, J. Nagel and C. E. Muller (2001). "Catalepsy induced by a blockade of dopamine D1 or D2 receptors was reversed by a concomitant blockade of adenosine A(2A) receptors in the caudate-putamen of rats." Eur J Neurosci **14**(8): 1287-1293.

Hernandez-Lopez, S., T. Tkatch, E. Perez-Garci, E. Galarraga, J. Bargas, H. Hamm and D. J. Surmeier (2000). "D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β]₁-IP₃-calcineurin-signaling cascade." J Neurosci **20**(24): 8987-8995.

Hillion, J., M. Canals, M. Torvinen, V. Casado, R. Scott, A. Terasmaa, A. Hansson, S. Watson, M. E. Olah, J. Mallol, E. I. Canela, M. Zoli, L. F. Agnati, C. F. Ibanez, C. Lluís, R. Franco, S. Ferre and K. Fuxe (2002). "Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A_{2A} receptors and dopamine D₂ receptors." J Biol Chem **277**(20): 18091-18097.

Hudmon, A. and H. Schulman (2002). "Neuronal CA₂⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function." Annu Rev Biochem **71**: 473-510.

Hurley, M. J., D. C. Mash and P. Jenner (2000). "Adenosine A(2A) receptor mRNA expression in Parkinson's disease." Neurosci Lett **291**(1): 54-58.

Illes, P., K. N. Klotz and M. J. Lohse (2000). "Signaling by extracellular nucleotides and nucleosides." Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol **362**(4-5): 295-298.

Ishida, A., I. Kameshita and H. Fujisawa (1998). "A novel protein phosphatase that dephosphorylates and regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II." J Biol Chem **273**(4): 1904-1910.

Jaakola, V. P. and A. P. Ijzerman (2010). "The crystallographic structure of the human adenosine A_{2A} receptor in a high-affinity antagonist-bound state: implications for GPCR drug screening and design." Curr Opin Struct Biol **20**(4): 401-414.

Jaber, M., S. W. Robinson, C. Missale and M. G. Caron (1997). "Dopamine receptors and brain function." Neuropharmacology **35**(11): 1503-1519.

Jackson, D. M. and A. Westlind-Danielsson (1994). "Dopamine receptors: Molecular biology, biochemistry and behavioural aspects." Pharmacology & Therapeutics **64**(2): 291-370.

Ji, T. H., M. Grossmann and I. Ji (1998). "G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions." J Biol Chem **273**(28): 17299-17302.

Kabbani, N., L. Negyessy, R. Lin, P. Goldman-Rakic and R. Levenson (2002). "Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor." J Neurosci **22**(19): 8476-8486.

Kase, H., A. Mori and P. Jenner (2004). "Adenosine A2A-receptor antagonists: beyond dopaminergic therapies for Parkinson's disease." Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies **1**(1): 51-57.

Kim, S. A., A. Hudmon, A. Volmer and M. N. Waxham (2001). "CaM-kinase II dephosphorylates Thr(286) by a reversal of the autophosphorylation reaction." Biochem Biophys Res Commun **282**(3): 773-780.

Klinger, M., M. Freissmuth and C. Nanoff (2002). "Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins." Cell Signal **14**(2): 99-108.

Kull, B., S. Ferre, G. Arslan, P. Svenningsson, K. Fuxe, C. Owman and B. B. Fredholm (1999). "Reciprocal interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors in Chinese hamster ovary cells co-transfected with the two receptors." Biochem Pharmacol **58**(6): 1035-1045.

Kull, B., P. Svenningsson and B. B. Fredholm (2000). "Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum." Mol Pharmacol **58**(4): 771-777.

Levey, A. I., S. M. Hersch, D. B. Rye, R. K. Sunahara, H. B. Niznik, C. A. Kitt, D. L. Price, R. Maggio, M. R. Brann and B. J. Ciliax (1993). "Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(19): 8861-8865.

Linden, J. (2001). "Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 775-787.

Liu, X. Y., L. M. Mao, G. C. Zhang, C. J. Papasian, E. E. Fibuch, H. X. Lan, H. F. Zhou, M. Xu and J. Q. Wang (2009). "Activity-dependent modulation of limbic dopamine D3 receptors by CaMKII." Neuron **61**(3): 425-438.

Mayfield, R. D., F. Suzuki and N. R. Zahniser (1993). "Adenosine A2a receptor modulation of electrically evoked endogenous GABA release from slices of rat globus pallidus." J Neurochem **60**(6): 2334-2337.

Milligan, G. and M. Bouvier (2005). "Methods to monitor the quaternary structure of G protein-coupled receptors." FEBS J **272**(12): 2914-2925.

Missale, C., S. R. Nash, S. W. Robinson, M. Jaber and M. G. Caron (1998). "Dopamine receptors: from structure to function." Physiol Rev **78**(1): 189-225.

Nava-Asbell, C., F. Paz-Bermudez, D. Erlij, J. Aceves and B. Floran (2007). "GABA(B) receptor activation inhibits dopamine D1 receptor-mediated facilitation of [(3)H]GABA release in substantia nigra pars reticulata." Neuropharmacology **53**(5): 631-637.

Navarro, G., M. S. Aymerich, D. Marcellino, A. Cortes, V. Casado, J. Mallol, E. I. Canela, L. Agnati, A. S. Woods, K. Fuxe, C. Lluís, J. L. Lanciego, S. Ferre and R. Franco (2009). "Interactions between calmodulin, adenosine A2A, and dopamine D2 receptors." J Biol Chem **284**(41): 28058-28068.

Navarro, G., J. Hradsky, C. Lluís, V. Casado, P. J. McCormick, M. R. Kreutz and M. Mikhaylova (2012). "NCS-1 associates with adenosine A(2A) receptors and modulates receptor function." Front Mol Neurosci **5**: 53.

Ng, G. Y. K., B. F. O'Dowd, S. P. Lee, H. T. Chung, M. R. Brann, P. Seeman and S. R. George (1996). "Dopamine D2 Receptor Dimers and Receptor-Blocking Peptides." Biochemical and Biophysical Research Communications **227**(1): 200-204.

Offermanns, S. (2003). "G-proteins as transducers in transmembrane signalling." Prog Biophys Mol Biol **83**(2): 101-130.

Onali, P., M. C. Olanas and G. L. Gessa (1985). "Characterization of dopamine receptors mediating inhibition of adenylate cyclase activity in rat striatum." Mol Pharmacol **28**(2): 138-145.

Orru, M., J. Bakesova, M. Brugarolas, C. Quiroz, V. Beaumont, S. R. Goldberg, C. Lluís, A. Cortes, R. Franco, V. Casado, E. I. Canela and S. Ferre (2011). "Striatal pre- and postsynaptic profile of adenosine A(2A) receptor antagonists." PLoS One **6**(1): e16088.

Paxinos, G. W., C. (2006). The rat brain in stereotaxic coordinates. USA.

Penn, R. B., A. N. Pronin and J. L. Benovic (2000). "Regulation of G protein-coupled receptor kinases." Trends Cardiovasc Med **10**(2): 81-89.

Pfleger, K. D. and K. A. Eidne (2006). "Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)." Nat Methods **3**(3): 165-174.

Phillis, J. W., R. A. Barraco, R. E. DeLong and D. O. Washington (1986). "Behavioral characteristics of centrally administered adenosine analogs." Pharmacol Biochem Behav **24**(2): 263-270.

Premont, R. T. (2005). "Once and future signaling: G protein-coupled receptor kinase control of neuronal sensitivity." Neuromolecular Med **7**(1-2): 129-147.

Premont, R. T. and R. R. Gainetdinov (2007). "Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins." Annu Rev Physiol **69**: 511-534.

Prinster, S. C., C. Hague and R. A. Hall (2005). "Heterodimerization of g protein-coupled receptors: specificity and functional significance." Pharmacol Rev **57**(3): 289-298.

Rangel-Barajas, C., I. Silva, M. Garcia-Ramirez, E. Sanchez-Lemus, L. Floran, J. Aceves, D. Erlij and B. Floran (2008). "6-OHDA-induced hemiparkinsonism and chronic L-DOPA treatment

increase dopamine D1-stimulated [(3)H]-GABA release and [(3)H]-cAMP production in substantia nigra pars reticulata of the rat." Neuropharmacology **55**(5): 704-711.

Rashid, A. J., C. H. So, M. M. Kong, T. Furtak, M. El-Ghundi, R. Cheng, B. F. O'Dowd and S. R. George (2007). "D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(2): 654-659.

Ribeiro, J. A., A. M. Sebastião and A. de Mendonça (2002). "Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications." Progress in Neurobiology **68**(6): 377-392.

Salamone, J. D., A. J. Betz, K. Ishiwari, J. Felsted, L. Madson, B. Mirante, K. Clark, L. Font, S. Korbey, T. N. Sager, J. Hockemeyer and C. E. Muller (2008). "Tremorolytic effects of adenosine A2A antagonists: implications for parkinsonism." Front Biosci **13**: 3594-3605.

Salamone, J. D., K. Ishiwari, A. J. Betz, A. M. Farrar, S. M. Mingote, L. Font, J. Hockemeyer, C. E. Muller and M. Correa (2008). "Dopamine/adenosine interactions related to locomotion and tremor in animal models: possible relevance to parkinsonism." Parkinsonism Relat Disord **14 Suppl 2**: S130-134.

Schiffmann, S. N., G. Fisone, R. Moresco, R. A. Cunha and S. Ferre (2007). "Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology." Prog Neurobiol **83**(5): 277-292.

Sebastiao, A. M. and J. A. Ribeiro (1996). "Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system." Prog Neurobiol **48**(3): 167-189.

Shindou, T., H. Nonaka, P. J. Richardson, A. Mori, H. Kase and M. Ichimura (2002). "Presynaptic adenosine A2A receptors enhance GABAergic synaptic transmission via a cyclic AMP dependent mechanism in the rat globus pallidus." Br J Pharmacol **136**(2): 296-302.

Snyder, S. H., J. J. Katims, Z. Annau, R. F. Bruns and J. W. Daly (1981). "Adenosine receptors and behavioral actions of methylxanthines." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(5): 3260-3264.

Sokoloff, P., B. Giros, M. P. Martres, M. L. Bouthenet and J. C. Schwartz (1990). "Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics." Nature **347**(6289): 146-151.

Strader, C. D., T. M. Fong, M. R. Tota, D. Underwood and R. A. Dixon (1994). "Structure and function of G protein-coupled receptors." Annu Rev Biochem **63**: 101-132.

Stromberg, I., P. Popoli, C. E. Muller, S. Ferre and K. Fuxe (2000). "Electrophysiological and behavioural evidence for an antagonistic modulatory role of adenosine A2A receptors in dopamine D2 receptor regulation in the rat dopamine-denervated striatum." Eur J Neurosci **12**(11): 4033-4037.

Surmeier, D. J., J. Ding, M. Day, Z. Wang and W. Shen (2007). "D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons." Trends Neurosci **30**(5): 228-235.

- Surmeier, D. J., W. J. Song and Z. Yan (1996). "Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons." J Neurosci **16**(20): 6579-6591.
- Svenningsson, P., C. Le Moine, G. Fisone and B. B. Fredholm (1999). "Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors." Prog Neurobiol **59**(4): 355-396.
- Svenningsson, P., C. Le Moine, B. Kull, R. Sunahara, B. Bloch and B. B. Fredholm (1997). "Cellular expression of adenosine A2A receptor messenger RNA in the rat central nervous system with special reference to dopamine innervated areas." Neuroscience **80**(4): 1171-1185.
- Tanganelli, S., K. Sandager Nielsen, L. Ferraro, T. Antonelli, J. Kehr, R. Franco, S. Ferre, L. F. Agnati, K. Fuxe and J. Scheel-Kruger (2004). "Striatal plasticity at the network level. Focus on adenosine A2A and D2 interactions in models of Parkinson's Disease." Parkinsonism Relat Disord **10**(5): 273-280.
- Tobimatsu, T. and H. Fujisawa (1989). "Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs." J Biol Chem **264**(30): 17907-17912.
- Tolkovsky, A. M. and A. Levitzki (1978). "Coupling of a single adenylate cyclase to two receptors: adenosine and catecholamine." Biochemistry **17**(18): 3811-3817.
- Tozzi, A., A. Tschertter, V. Belcastro, M. Tantucci, C. Costa, B. Picconi, D. Centonze, P. Calabresi and F. Borsini (2007). "Interaction of A2A adenosine and D2 dopamine receptors modulates corticostriatal glutamatergic transmission." Neuropharmacology **53**(6): 783-789.
- Tuccinardi, T., G. Ortore, C. Manera, G. Saccomanni and A. Martinelli (2006). "Adenosine receptor modelling. A1/A2a selectivity." Eur J Med Chem **41**(3): 321-329.
- Valls, M. D., B. N. Cronstein and M. C. Montesinos (2009). "Adenosine receptor agonists for promotion of dermal wound healing." Biochem Pharmacol **77**(7): 1117-1124.
- Vetter, S. W. and E. Leclerc (2003). "Novel aspects of calmodulin target recognition and activation." Eur J Biochem **270**(3): 404-414.
- Vidi, P. A., J. Chen, J. M. Irudayaraj and V. J. Watts (2008). "Adenosine A(2A) receptors assemble into higher-order oligomers at the plasma membrane." FEBS Lett **582**(29): 3985-3990.
- Wang, D., W. Sadee and J. M. Quillan (1999). "Calmodulin binding to G protein-coupling domain of opioid receptors." J Biol Chem **274**(31): 22081-22088.
- Woods, A. S. and S. Ferre (2005). "Amazing stability of the arginine-phosphate electrostatic interaction." J Proteome Res **4**(4): 1397-1402.

Woods, A. S., D. Marcellino, S. N. Jackson, R. Franco, S. Ferre, L. F. Agnati and K. Fuxe (2008). "How calmodulin interacts with the adenosine A(2A) and the dopamine D(2) receptors." J Proteome Res **7**(8): 3428-3434.

Wurch, T., A. Matsumoto and P. J. Pauwels (2001). "Agonist-independent and -dependent oligomerization of dopamine D(2) receptors by fusion to fluorescent proteins." FEBS Lett **507**(1): 109-113.

Ye, Y., J. Wei, X. Dai and Q. Gao (2008). "Computational studies of the binding modes of A 2A adenosine receptor antagonists." Amino Acids **35**(2): 389-396.

Zezula, J. and M. Freissmuth (2008). "The A(2A)-adenosine receptor: a GPCR with unique features?" Br J Pharmacol **153 Suppl 1**: S184-190.